

生命科学实验指南系列



Plant Proteomics
Methods and Protocols

植物蛋白质组学
实验指南

〔法〕 H. 蒂勒门特　M. 齐维　C. 达默韦尔　V. 米琴　主编

沈世华　等 译





科 学 出 版 社

生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人工细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



定价（全套）：4500.00元

生命科学实验指南系列·典藏版

植物蛋白质组学实验指南

Plant Proteomics

Methods and Protocols

〔法〕H. 蒂勒门特 M. 齐维 C. 达默韦尔 V. 米琴 主编

沈世华 等 译

科学出版社

北京

图字：01-2008-2162 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

Translation from the English language edition:
Plant Proteomics edited by Hervé Thiellement

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

致　谢

陈晖、范卫红、韩锋、纪魁显、刘辉、刘蕴、杨静、杨明峰、杨平仿、阳振乐、赵雪等参与了本书的前期翻译及后期校对工作，在此一并致谢！

沈世华

2012年12月于北京香山

编者名单

AJITH ANAND • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
EMMANUELLE BANCEL • *INRA Station d'Amélioration et Santé des Plantes, Clermont Ferrand, France*
MURIEL BARDOR • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
GÉRARD BRANLARD • *INRA Station d'Amélioration et Santé des Plantes, Clermont Ferrand, France*
HANS-PETER BRAUN • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
LINDA BRECI • *Department of Chemistry, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
DELPHINE CENTENO • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
JAMILA CHAÏB • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
FRANÇOIS CHEVALIER • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
MIREILLE CHEVALLET • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
CATHERINE DAMERVAL • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
FRÉDÉRIC DELOM • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*
KÅRE ENGKILDE • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
HOLGER EUBEL • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
MIREILLE FAUROBERT • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
LOÏC FAYE • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
TANJA FEILNER • *Department of Biochemistry, University College Cork, Cork, Ireland*
ANNE-CATHERINE FITCHETTE • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
LISA GIACOMELLI • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
RÉMY GIBRAT • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*

FERNANDO GONZÁLEZ-CAMACHO • *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*
ANGELIKA GÖRG • *Technische Universität München, Fachgebiet Proteomik, Freising-Weihenstephan, Germany*
PAUL A. HAYNES • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch and Department of Biochemistry and Molecular Biophysics1, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
EMILY HATTRUP • *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
JOSHUA L. HEAZLEWOOD • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
JESCO HEINEMEYER • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
FATIMAH HICKMAN • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
SUSANNE JACOBSEN • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
JOHANN JOETS • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
MATTHEW KEELER • *Department of Biochemistry and Molecular Biophysics, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
JULIA KEHR • *Max-Planck-Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam, Germany*
BIRGIT KERSTEN • *RZPD German Resource Center for Genome Research GmbH, Berlin, Germany*
SETSUKO KOMATSU • *Laboratory of Gene Regulation, Department of Molecular Genetics, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan*
OLIVIER LANGELLA • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
CÉLINE LALANNE • *INRA, UMR BIOGECO, Equipe de Génétique, 69 route d'Arcachon, 33612 Cesta Cédex, France*
ZHENTIAN LEI • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
JESSICA LETARTE • *Bio5 Institute for Collaborative Bioresearch2, The University of Arizona, Tucson, Arizona*
DAGMAR LEWEJOHANN • *Abteilung Angewandte Genetik, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Hannover, Hannover, Germany*
SYLVIE LUCHE • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
VALÉRIE MÉCHIN • *UMR de Chimie Biologique, Thiverval Grignon, France*
FRANCISCO JAVIER MEDINA • *Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*

A. HARVEY MILLAR • *ARC Centre of Excellence in Plant Energy Biology, The University of Western Australia, Perth, Australia*
KIRANKUMAR S. MYSORE • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
LUC NEGRONI • *Faculté de Médecine, Plate-forme Protéomique, Nice, France*
ESTHER PELPOIR • *INRA Avignon, UR de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Montfavet, France*
JEAN-BENOIT PELTIER • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
CHRISTOPHE PLOMION • *NRA, UMR BIOGECO, Equipe de Génétique, Cestas, France*
THIERRY RABILLOUD • *Laboratoire d'Immunologie, CEA, Grenoble, France*
MARTIJN REP • *Plant Pathology, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*
VALÉRIE ROFIDAL • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
MICHEL ROSSIGNOL • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
VÉRONIQUE SANTONI • *Biochimie et Physiologie Moléculaire des Plantes, INRA, Montpellier, France*
NICOLAS SOMMERER • *Laboratoire de Protéomique, INRA, Montpellier, France*
IB SØNDERGAARD • *BioCentrum-DTU, Biochemistry and Nutrition Group, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark*
LLOYD W. SUMNER • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
WOJCIECH SZPONARSKI • *Plant Biochemistry & Molecular Physiology, INRA, Montpellier, France*
HERVÉ THIELLEMENT • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*
OLIVIA TRAN DINH • *CNRS UMR 6037, IFRMP 23, GDR 2590, Université de Rouen, Mont Saint-Aignan, France*
MARIA V. TURKINA • *Division of Cell Biology, Linköping University, Linköping, Sweden.*
ALEXANDER V. VENER • *Division of Cell Biology, Linköping University, Linköping, Sweden.*
BONNIE S. WATSON • *The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma*
WALTER WEISS • *Technische Universität München, Fachgebiet Proteomik, Am Forum 2, Freising-Weihenstephan, Germany*
KLAAS J. VAN WIJK • *Department of Plant Biology, Cornell University, Ithaca, New York*
MICHEL ZIVY • *UMR de Génétique Végétale, La Ferme du Moulon, Gif-sur-Yvette, France*

前　言

本书的宗旨是提供已被植物蛋白质组学领域的科学家验证的先进实验方法和解决问题的对策。在25年前，当第一篇关于植物蛋白质组学的文章发表时，这个领域确实很小，但是随着这些年飞速的发展，在全世界范围内的大多数国家，有很多实验室正在开展植物蛋白质组学研究。

双向电泳仍然是研究植物蛋白质组学的最常用的基本方法，但第一向电泳采用IPG技术（第13章）和检测蛋白质点采用荧光染料新方法（第14章和第15章），使双向电泳技术得到了很大的改进。对于植物组织，因为其中常含有酚、蛋白酶和其他次级代谢产物而影响蛋白质的提取，但在这方面已经有良好的进展。对于从特殊植物组织（第3～5章）和细胞器（第6章和第10章）中提取蛋白质的操作步骤已经进行了标准优化（第1章和第2章）。而这些蛋白质提取的方法取决于膜蛋白在提取液中的增溶情况（第11章和第12章）。尽管传统的Edman测序方法最早用于蛋白质鉴定，但是质谱的出现是技术上一个重要革新，因为它不仅能高通量鉴定从双向电泳中分离的蛋白质点（第19章和第20章），还能直接鉴定第一向蛋白质条带中的蛋白质（第27章和第28章）。结合其他技术如双向液相色谱或完整蛋白质的液相色谱技术，质谱同样可以从混合物中鉴定多肽（第21章和第22章）。现今，植物蛋白质组学主要关注的研究领域是翻译后修饰的分析和蛋白质之间的互作关系（第24～29章）。最后，通过蛋白质组学方法得到的各种数据（定性和定量数据、光谱数据）已经整理成数据库并通过互联网共享（第23章），同时为了有效地分析数据的丰度，统计工具也是必不可少的（第16章和第17章）。

对于初学者来说，不论是在潮湿或干燥的实验室，按照书中作者提供的各种详细的植物蛋白质组学实验方法，都能取得理想的实验结果。专业的蛋白质组学科研人员同样能从此书中获益来解决他们不常碰到的技术问题。

H. 蒂勒门特
M. 齐维
C. 达默韦尔
V. 米琴

目　录

第1章　三氯乙酸-丙酮法提取植物全蛋白

Valérie Méchin，Catherine Damerval 和 Michel Zivy

摘要　本章我们介绍一种适用于各种植物组织全蛋白抽提的高效方法。该方法利用三氯乙酸和含有β-巯基乙醇的丙酮在沉淀蛋白质的同时使其变性。同时，我们还将介绍分别在进行经典的 IEF 电泳或用 IPG 胶条电泳之前的蛋白质溶解方法。整个过程简单易行，但在操作过程中必须注意以下两点：①抽提必须在低温下进行；②蛋白质溶解过程应在 22～25℃条件下进行以免尿素沉淀。

关键词　蛋白质抽提；蛋白质溶解；三氯乙酸（TCA）；丙酮；总蛋白；离合剂；变性剂；还原剂；植物蛋白质组学

1.1　前　　言

在蛋白质组研究中，双向电泳图谱的比较占有重要地位。双向电泳必须能很好地分离各个蛋白质，应尽量避免拖尾、横纹或因蛋白质降解而产生的假相。蛋白质在图谱上的分布模式必须是可重复的。蛋白质样品的制备是这些条件得以保持的重要前提。植物蛋白提取的难点在于植物细胞中蛋白质的含量低，同时还含有很多干扰蛋白提取的有机物，如酚类、色素、脂类及核酸等[1]。提取出的蛋白必须溶解在与等电聚焦（IEF）电泳缓冲系统兼容的样品溶液中。

经过在各种植物组织中的试验，我们建立了一种以三氯乙酸和丙酮使蛋白质变性并沉淀的提取方法。本方法起源于 Wu 和 Wang[2]最初关于三氯乙酸沉淀蛋白质能高效抑制蛋白酶活性的报道。提取出来的蛋白质最后溶解在尿素-碳酸钾-SDS（UKS）[3]溶液中。用本方法提取的蛋白质样品在电泳中具有很好的重复性，同时对于高分子质量和高等电点的蛋白质也有很好的分辨率，因而被广泛使用，且命名为三氯乙酸/丙酮法[4,5]。UKS 样品缓冲液适合用于最初的自制管胶进行的等电聚焦电泳。这种自制管胶进行等电聚焦时，pH 梯度是在施加电压后由两性电解质移动形成。20 世纪 90 年代开始出现的商品化的 IPG 胶条用于等电聚焦电泳，大大提高了电泳的重复性，因而被广泛使用。然而，使用 IPG 胶条进行等电聚焦时，需要施加很高的电压，而 UKS 溶液中的高含盐量和 SDS 使得该缓冲液不适合这种等电聚焦系统[6]，因而必须采用新的样品缓冲液。

本章，我们将着重描述分别为进行传统的等电聚焦和现代的 IPG 等电聚焦电泳制备样品所采用的不同步骤。

1.2 材　　料

1.2.1 蛋白沉淀溶液

含 10%（*m/V*）三氯乙酸和 0.07% β-巯基乙醇（2ME）（*V/V*）的丙酮（低温）。应在使用前新鲜配制，并置于－20℃条件下直到使用（见注释 1）。

注意：3 种试剂均有毒，必须在通风橱中配制。

1.2.2 清洗溶液

含 0.07% 2ME（*V/V*）的丙酮，可在－20℃下贮存约 1 个月。

1.2.3 R2D2 蛋白质溶解缓冲液

5mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、2% 3-［3-（胆酰胺丙基）二甲氨基］丙磺酸内盐（CHAPS；*m/V*）、2%癸基二甲基铵基丙烷硫酸盐（SB3-10）（*m/V*）、20mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）、5mmol/L 磷化氢、0.5% 两性电解质（pharmalyte）（*V/V*）pH 4～6.5、0.25%两性电解质（pharmalyte）（*V/V*）pH 3～10，以双蒸水配制。配制时可以稍微加热（不高于 30℃，见注释 2）以溶解尿素。配制好的溶液可以分装保存在－80℃下数月（注释 3）。

1.2.4 UKS 蛋白质溶解缓冲液

9.5mol/L 尿素、5mmol/L K_2CO_3、1.25% SDS、5% DTT、6% Triton X-100、2%两性电解质（ampholines）pH 3.5～9.5，以双蒸水配制。K_2CO_3 可以配制成 2.8%（*m/V*）、SDS 配制成 10%（*m/V*）（过滤）、Triton X-100 配制成 20%的贮存液，加入其他成分和 3ml 双蒸水直到尿素溶解（可加热至 30℃以下，见注释 2）。配制好的溶液可以分装保存在－80℃条件下数月。

1.2.5 蛋白质浓度测定

溶解于 UKS 或 R2D2 中的蛋白质可以用 Amersham Biosciences 的 2-D Quant 试剂盒进行定量。该方法的主要原理是先将蛋白质沉淀，然后用铜离子与蛋白质进行特异结合，具体过程参见产品说明书（ref. 80-6483-56）。该方法与绝大多数在蛋白质制备过程中使用的试剂都兼容。

1.2.6 IPG 胶条水化液（仅适用于 UKS 制备的样品）

（1）溶液 A：7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、1.4% CHAPS（*m/V*）、16mmol/L DTT、5mmol/L 磷化氢、0.3%两性电解质（pharmalyte）pH 3～10（*V/V*），双蒸水配制。

（2）溶液 B：7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、0.5% CHAPS（*m/V*）、10mmol/L

DTT、5mmol/L 磷化氢，双蒸水配制。

1.3 方　法

1.3.1 蛋白质沉淀与变性

(1) 用研钵和研槌在液氮中将植物材料研磨成细小的粉末（见注释 4）。

(2) 将约 200μl 粉末转移到 2ml 的离心管中，加入 1.8ml 预冷的三氯乙酸-2ME-丙酮溶液（见注释 5），混和后置于－20℃ 1h。三氯乙酸和丙酮可以使蛋白质变性并沉淀，同时还可以使各种多酚氧化酶和其他氧化酶类失活，从而阻止因酚类被氧化为醌类而导致的蛋白质互相结合形成难溶的复合体。该方法同酚抽提法[7,8]一样都能使蛋白酶失活[3]。丙酮还可以溶解植物细胞内的各种色素、脂质以及萜类化合物。而 2ME 则可以阻止蛋白沉淀过程中二硫键的形成。

(3) 10 000*g* 下冷冻离心机中离心 10min。

1.3.2 2ME-丙酮溶液清洗蛋白质样品

(1) 弃掉离心所得上清后用 1.8ml 预冷的清洗液（见注释 5）悬浮沉淀。－20℃静置 1h。清洗目的在于去除残存的三氯乙酸，避免因为酸化作用而导致的蛋白质难以复性溶解。

(2) 10 000*g* 下冷冻离心机中离心 15min。

(3) 弃掉上清液，重复清洗操作 2 次（见注释 6）。

(4) 将沉淀进行真空干燥 1h（或 SpeedVac 中干燥 20～30min）以完全去除残留的丙酮。

(5) 称量沉淀重量（见注释 7）。

1.3.3 蛋白质的溶解

(1) 溶解蛋白质样品所需 UKS 或 R2D2 的量根据不同植物组织而定。例如，对于玉米和葡萄叶片的蛋白质样品我们按 60μl/mg 干粉的比例进行溶解，而对玉米粒的蛋白样品则按 50μl/mg 干粉的比例进行溶解。

(2) 振荡 1min 即可重新溶解干粉样品。此时，样品中含有细胞碎片。

(3) 10 000*g* 室温下离心 15min，收集上清于另一离心管中。

(4) 再次离心 15min，上清液即为所得蛋白质样品，可以在－50 或－80℃保存数月。

一般而言，用于悬浮和溶解蛋白质样品的溶液中都含有离合剂、变性剂以及还原剂[9]。离合剂可以打断蛋白质内部的非共价键，从而帮助蛋白质去折叠。最普遍使用的离合剂是尿素和硫脲。常常将两者结合使用以提高对蛋白质的溶解效率。而在使用离合剂的同时，必须使用变性剂才能增加对蛋白质的溶解。CHAPS 是一种兼性离子变性剂，它和非离子变性剂 Triton X-100 具有相同的助溶能力，但是它能更有效地阻止蛋白质之间的相互作用。SB3-10 比 CHAPS 具有更强的助溶能力，但是它在尿素浓度较

高的溶液中难以溶解。巯基还原剂（最常见的如 DTT）和氢化磷可以阻止二硫键的形成。磷化氢比 DTT 具有更强的选择性和更高的效率，它在酸性条件和 pH 大于 7.5 的环境下仍能保持还原能力。常常以 TCEP-HCl（tris carboxyethyl phosphine）的形式保存，相比 TBP 的保存形式，该形式更稳定、难挥发、更容易溶于水。

在 R2D2 蛋白质溶解液适用于用 IPG 胶条进行等电聚焦，该溶液的配制结合使用尿素与硫脲（见注释 2）、CHAPS 与 SB3-10、DTT 与磷化氢。

UKS 溶液是早期在发现硫脲与兼性离子变性剂可以大大增加蛋白质的溶解前常常使用的一种蛋白质溶解液。该溶液含有较高浓度的尿素（接近饱和，见注释 2），使用的是 Triton X-100 而不是 CHAPS 和 SB3-10。UKS 的特点在于含有离子变性剂 SDS，可以大大提高蛋白质的溶解效率，抑制蛋白酶的活性[10]。尽管作为离子变性剂 SDS 与等电聚焦缓冲系统不兼容，但是因为 Triton X-100 的存在能和 SDS 形成胶态离子，在电泳过程中移到阴极，故缓冲系统能够容忍该浓度 SDS 的存在。UKS 也含有 K_2CO_3 可以使得缓冲系统碱性化，从而组织蛋白质与蛋白质以及蛋白质与核酸之间的互作，抑制蛋白酶活性。

R2D2 既可以用来溶解蛋白质样品，也可以用来水化 IPG 胶条；而当使用 UKS 溶解的蛋白质样品时，则必须使用另外一种 IPG 胶条水化液。两种溶解液的蛋白质溶解能力大致相当，因此，建议只使用其中一种。如果制备的样品中可能会有较多的蛋白酶时，推荐使用 UKS。向两种溶液中加入两性电解质可以提高等电聚焦电泳的分辨能力。

1.3.4 IEF 电泳前蛋白质样品的准备

（1）蛋白质样品在电泳前需要再次离心，去除沉淀。

（2）若采用硝酸银染色法，每根胶条（24cm 长，自制胶或 IPG 胶条）的上样量约为 50μg 蛋白质（图 1-1A、B）；若采用 CBB 染色法，则为 150～500μg（图 1-1C、D）。

（3）溶解在 R2D2 中的蛋白质样品可以在用 R2D2 溶液补足体积至 450μl 后直接用来水化 IPG 胶条[6]。

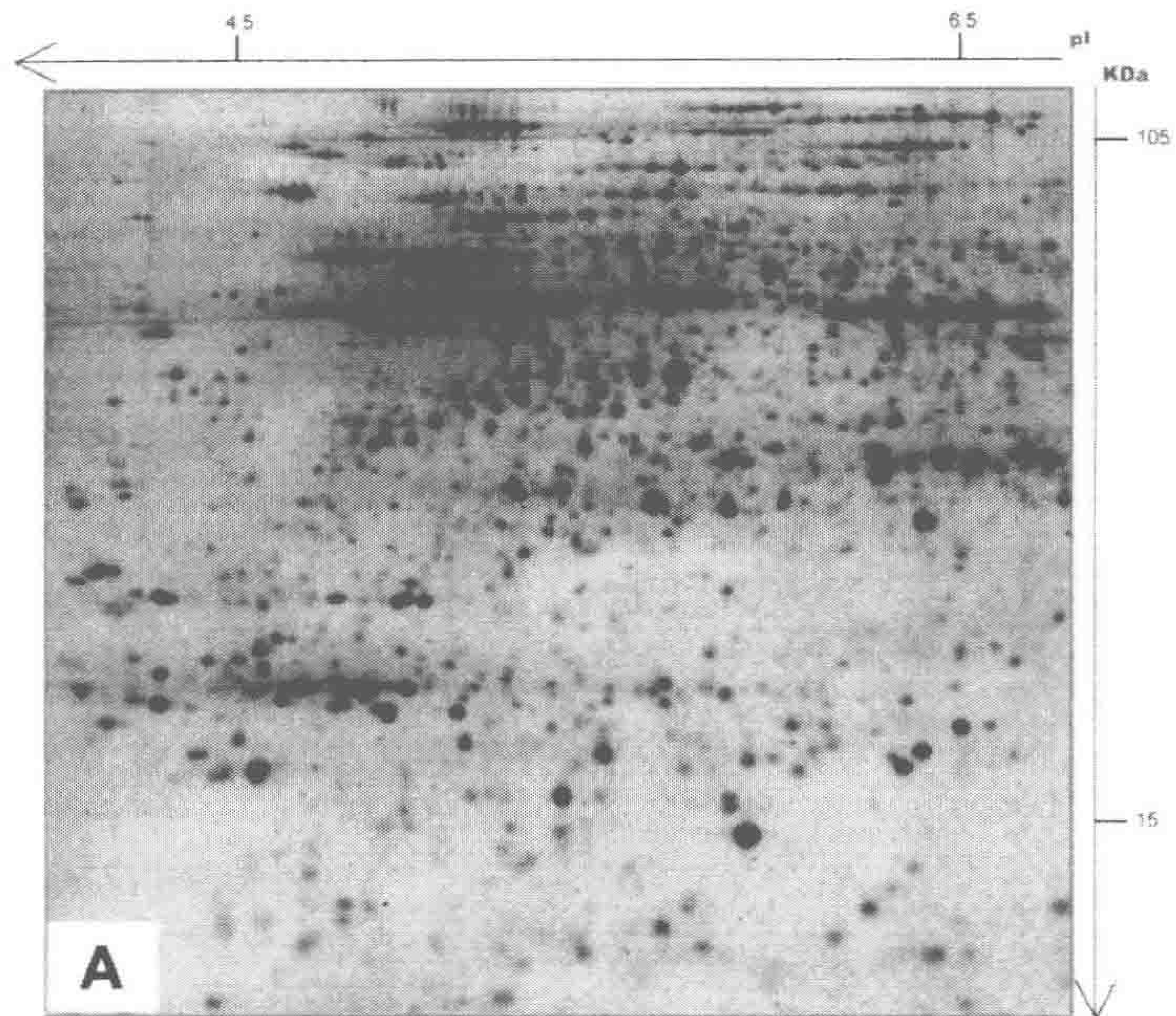
溶解在 UKS 中的样品可以直接用来进行传统的等电聚焦电泳[3]。若采用 IPG 胶条进行等电聚焦，则必须用另外配制的水化液（图 1-1A、B，见注释 8）补足体积至 450μl 后进行水化。单独配制的水化液含有硫脲、CHAPS 及三氢化磷，同时还可以降低 SDS 的浓度，提高分辨率。

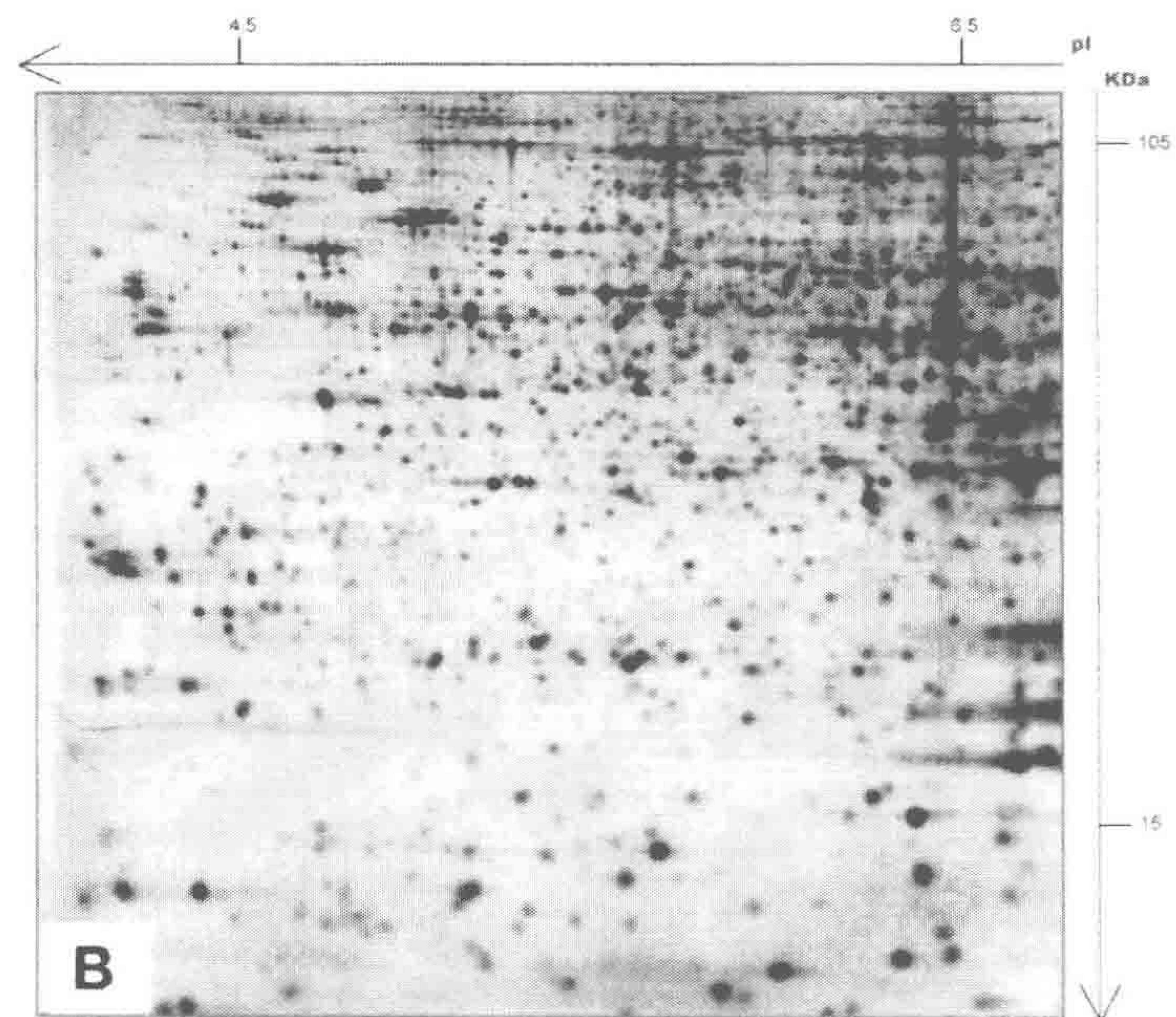
1.4 注　　释

（1）蛋白质沉淀剂和重悬液在使用前必须预冷。始终将丙酮溶液放在 4℃条件下。

（2）UKS 和 R2D2 溶液中均含有较高浓度的尿素，需要稍微加热溶解。但切记加热温度不可超过 30℃，否则尿素会裂解产生异硫氰酸从而导致蛋白质的氨甲酰化。

（3）SB3-10 在尿素中很难溶解（这也是为什么尿素浓度限制在 5mol/L 的原因），因此在解冻 R2D2 溶液时需要较长时间，必须待溶液完全澄清后方可使用。


4.5
6.5
pI
KDa
105
15
A


4.5
6.5
pI
KDa
105
15
B

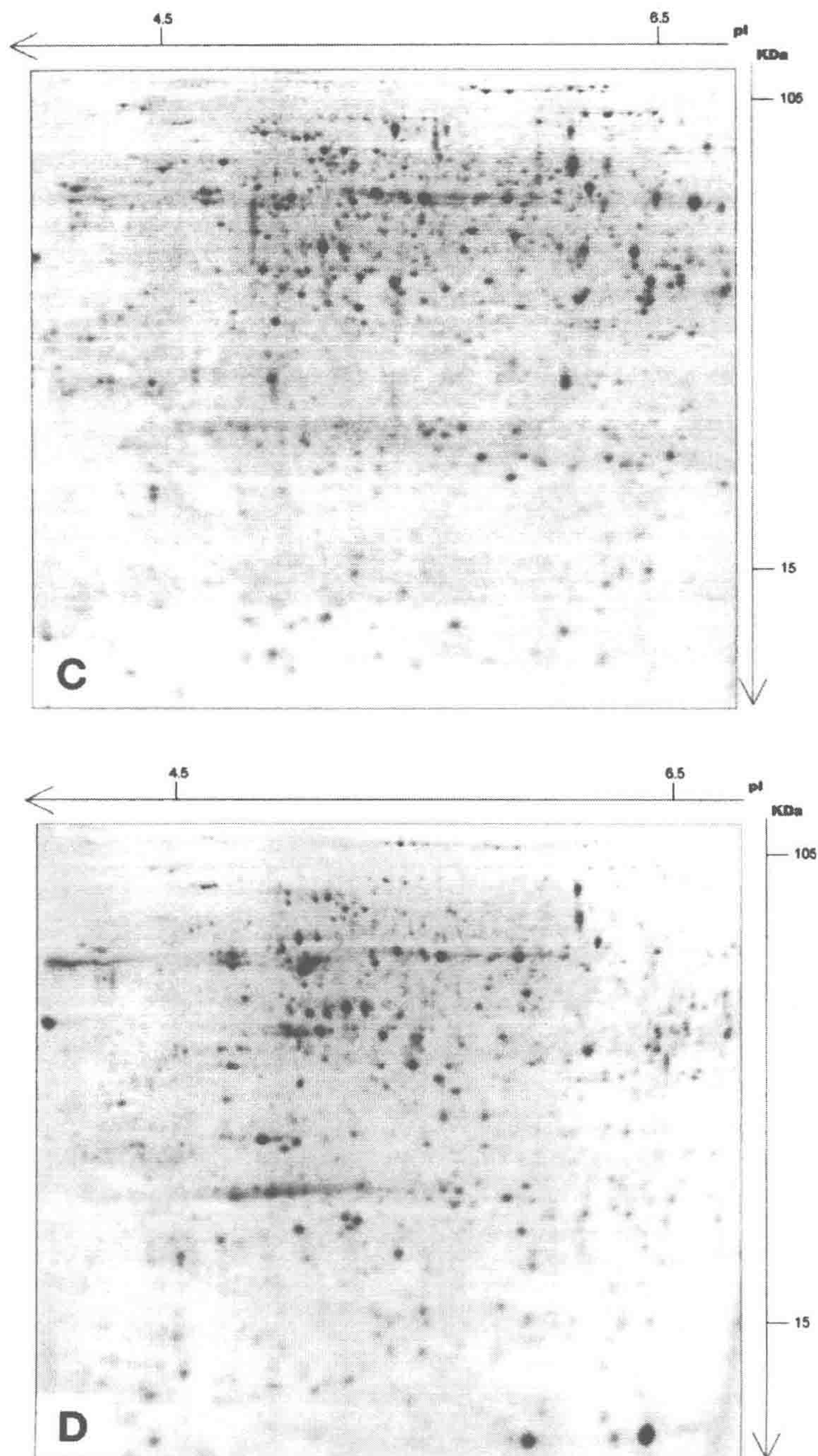


图 1-1　三氯乙酸/丙酮法提取蛋白质后用 R2D2 溶液溶解的蛋白质样品的双向电泳图谱

A 和 B 分别代表玉米叶片和授粉 14 天后的玉米胚乳蛋白质样品。C 和 D 分别代表葡萄茎和根的蛋白质样品。含 50μg（A、B）或 250μg（C、D）蛋白质样品的水化液浸泡 IPG 胶条（线性，pH4～7）进行被动水化 1h；然后在 50V 电压、22℃主动水化 12h；依次按 200V 0.5h、500V 0.5h、1000V 和 10 000V 分别 1h（总计达到84 000Vh）的程序电泳进行等电聚焦。完成了等电聚焦的 IPG 胶条经过平衡后横置于第二向电泳胶的顶端，用 1%的琼脂糖密封胶条和第二向胶之间的缝隙，注意不要有气泡。一般第二向采用连续的 11%分离胶和 25%浓缩胶，以 1，4-双丙烯酰哌嗪为交联剂。在 SDS-PAGE 完成后分别用硝酸银（A、B）或 CBB G-250（C、D）进行染色

（4）要想获得较高的蛋白质提取效率，必须将植物组织预先研磨成非常细小的粉末。对于某些坚硬的植物组织（如玉米粒），在研磨前必须先将其破碎。也可以用加有金属小球（6mm 直径）的自动粉碎机进行磨样。

（5）在蛋白质干燥前，所有操作都必须在低温下（低于 4℃）进行以免蛋白酶降解蛋白质。

（6）对于含色素较多的样品，可以增加清洗的次数，或者延长清洗的时间（过夜），以最后得到白色的沉淀。

（7）也可以将蛋白质干粉冻存在－80℃条件下，但是将干粉取出进行溶解前，最好再次进行干燥。

（8）根据所需样品的体积量决定水化前是选择溶液 A 还是溶液 B。当只需要 20～90μl 样品量时，用溶液 A 去稀释溶解在 UKS 中的蛋白质样品，当需要较大体积的样品量时，选择溶液 B。这样可以控制合适的离子浓度进行 IPG 等电聚焦。

参 考 文 献

1. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., and de Vienne, D. (1988) Two-dimensional electrophoresis in plant biology, in *Advances in electrophoresis* (Chrambach, A., Dunn, M., and Radola, B., eds.), VCH, Weinheim, New York, pp. 265–340.
2. Wu, F. and Wang, M. (1984) Extraction of proteins for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis from protease-rich plant tissues. *Anal. Biochem.* **139,** 100–103.
3. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis* **7,** 52–54.
4. Saravanan, R. S. and Rose, J. K. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4,** 2522–2532.
5. Carpentier, S. C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5,** 2497–2507.
6. Méchin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., and Damerval, C. (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3,** 1299–1302.
7. Hurkman, W. and Tanaka, C. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81,** 802–806.
8. Granier, F. (1988) Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9,** 712–718.
9. Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20,** 660–663.
10. Colas des Francs, C., Thiellement, H., and de Vienne, D. (1985) Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis: protease action as exemplified by ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase degradation and procedure to avoid proteolysis during extraction. *Plant Physiol.* **78,** 178–182.

第2章　顽拗性植物组织的蛋白质组学研究：苯酚法提取蛋白质

Mireille Faurobert，Esther Pelpoir 和 Jamila Chaib

摘要　蛋白质提取除了经典的三氯乙酸（TCA）/丙酮沉淀方法外，另一个可行的方法是苯酚提取法，该方法可以从富含多糖、脂质和酚类化合物的植物组织中有效地获得蛋白质，并去除非蛋白质成分。本章提出一种改良的实验方法，可用于双向电泳（2-DE）和进一步的蛋白质组学研究。苯酚提取之后，蛋白质在甲醇中和乙酸铵一起沉淀，沉淀重悬于等电聚焦缓冲液（isoelectric focusing buffer），电泳前用改良的 Bradford Assay 方法测定蛋白质浓度。

成功使用这个方案的关键点有两个：①在第一步中使样品保持低温状态；②在离心后小心转移到苯酚层。

关键词　提取方法；蛋白质；苯酚；植物蛋白质组学；膜蛋白；双向电泳；糖蛋白

2.1　前　　言

提取蛋白质是蛋白质组学研究的第一步。植物组织的蛋白质含量较低，并且存在多种非蛋白质成分，如细胞壁及贮藏多糖、脂质和酚类化合物，使蛋白质的提取难度增大。植物蛋白质的可溶性与它们的细胞内定位关系密切，传统的蛋白质提取方法是用水合缓冲液、去垢剂或直接沉淀法[1]。除了普遍使用的 TCA/丙酮沉淀法[2]，Hurkman 和 Tanaka[3]在 1986 年报道了一种先用苯酚提取然后用甲醇/乙酸铵沉淀的蛋白质提取方法，能有效去除核酸干扰，因为核酸可以与蛋白质相互作用，使双向电泳背景深，分辨率低。

苯酚提取法首先是应用于纯化碳水化合物（去除蛋白质），然后是用于纯化核酸。对于分子生物学家来讲，酚抽提是一种从核酸溶液中去除蛋白质的首选方法。

苯酚是最简单的芳香醇，芳香环上带有一个极性羟基，弱酸性，并且有腐蚀性和毒性。苯酚与水部分混溶：当达到饱和时，水相含有大约 7%的苯酚，有机相含有大约 28%的水。苯酚主要是通过氢键和蛋白质相互作用，使蛋白质变性并且溶于有机相中。因此，和一般认为的不同，蛋白质并不是留在水相和有机相的界面上，而是进入了苯酚中。

苯酚提取法主要应用于研究黏韧性植物组织或器官，如木薯[4]和油菜的幼苗[5]，马铃薯、苹果和香蕉的叶片[6]，橄榄叶[7]，以及番茄、鳄梨和香蕉的果实[8]。

Carpentier 等、Saravanan 和 Rose 比较用 TCA/丙酮沉淀法和苯酚提取法从黏韧性

组织中提取蛋白质，发现两种方法都有效，但苯酚提取法能够更有效地除去干扰物质，得到背景浅、垂直拖尾少的高质量凝胶。这两种方法可减少蛋白质在样品准备过程中由于内在蛋白质水解活动而引起的降解。同时，苯酚提取法可以得到更多糖蛋白。

苯酚提取法有高度的清洁能力。它能够作为一种分离剂，降低蛋白质和其他分子间的相互影响。苯酚提取法最主要的不足在于它时间消耗过长（至少6h），另外苯酚和甲醇都是有毒的。

2.2 材　料

2.2.1　苯酚

饱和Tris-HCl缓冲液，pH6.6/7.9（Amresco-Interchim，biotechnology grade）。

2.2.2　提取缓冲液

准备一份含有500mmol/L Tris-HCl缓冲液、500mmol/L EDTA、700mmol/L蔗糖、100mmol/L KCl的溶液，并用HCl调pH至8.0。这种溶液可以在4℃保存一周。

在提取之前加入2% β-巯基乙醇和1mmol/L苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride）（PMSF，见注释1）。

2.2.3　沉淀液

含0.1mol/L乙酸铵的冷甲醇。此溶液可以被保存在－20℃。

2.2.4　等电聚焦缓冲液

9mol/L尿素、4% CHAPS、0.5% Triton X-100、20mmol/L二硫苏糖醇（DTT）、1.2%两性电解质（pharmalytes），pH3～10（见注释2）。Triton X-100的初始浓度为10%。这种溶液需分装后保存在－20℃，可保存数月。

2.2.5　测定蛋白质溶液的浓度

用来自Bio-Rad的染色剂，根据改良的考马斯亮蓝法，测定蛋白质浓度（见注释3）。

2.3 方　法

2.3.1　蛋白质提取

（1）新鲜植物组织在液氮中冷冻，然后在自动低温粉碎机中预先冷却的钢杯中将材料研磨成细碎的粉末（见注释4）。

（2）在一个15ml的离心管（falcon tube）中加入3ml提取缓冲液，并加入1g研碎的植物组织，涡旋后在冰浴中振荡10min（见注释5）。

(3) 加入等体积的 Tris 饱和苯酚，室温下振荡 10min（见注释 6）。

(4) 样品在 5500g 和 4℃的条件下离心 10min，从上到下分成有机相，水相和沉淀的不溶物质（见注释 7），小心地将最上层的苯酚转移到新的离心管中，注意避免触碰到中间层。

(5) 含蛋白质的苯酚液中加入 3ml 的提取缓冲液进行反萃取（back-extract）。振荡 3min 后涡旋。然后样品在 5500g 和 4℃条件下离心 10min。

(6) 转移上层酚相到新离心管中，并加入 4 倍体积的沉淀液。颠倒振荡离心管，在 −20℃条件下沉淀至少 4 h，或者过夜。

(7) 离心沉淀蛋白质（10min、5500g、4℃）。

(8) 离心后，用预冷沉淀液漂洗沉淀 3 次，最后用预冷丙酮漂洗。在每一次漂洗后，样品都要离心（5min，5500g、4℃）。

(9) 真空干燥沉淀（见注释 8）。

蛋白质首先被提取到含有几种保护剂的 Tris 缓冲液中。EDTA 通过螯合金属离子来抑制金属蛋白酶（metalloprotease）和多酚氧化酶（polyphenol oxidases）。PMSF 能够不可逆地抑制丝氨酸蛋白酶（serine protease）。β-巯基乙醇是一种防止蛋白质被氧化的还原剂。此外，为抑制蛋白酶活性，实验温度必须保持在 4℃以下，第一步提取要在冰浴中进行。尽量缩短提取时间。使用 KCl 是因为它的盐溶性效果好，这可以提高蛋白质溶解度而有利于蛋白质提取。

相对于传统的苯酚提取法，Wang 等提出另一种可行方法[7]，由于加入了十二烷基磺酸钠（SDS），因此称为苯酚/SDS 提取法。这种方法明显增大了从橄榄叶组织中的蛋白质提取量，双向电泳比较清晰，并且比起单用苯酚得到更多更浓的蛋白点。但是，加入 SDS 不能使从香蕉、苹果和马铃薯叶片中提取蛋白质的效果提高。

含蔗糖的 Tris 缓冲液比 Tris 饱和苯酚密度大。所以在相分离时，可以使苯酚相更快地分离到离心管的最上部，有利于转移苯酚相（见注释 7）。在上部的苯酚相中含有胞质蛋白和膜蛋白。

pH8.0 的 Tris 饱和酚溶液能保证核酸分离至缓冲液相中，而不使核酸留在苯酚相中。

蛋白质通常用加入盐或者水溶性有机溶剂的方法进行分离。在这里，两种方法都被应用。4 倍体积的甲醇可以有效地分离出大部分蛋白质。但是，甲醇从酸性溶液中提取蛋白质的效果较差。使用有机碱或缓冲液（乙酸铵）可以解决这个问题。

2.3.2　蛋白质的溶解和定量

(1) 蛋白质沉淀重悬于 IEF 缓冲液。如果起始材料是 1g 新鲜的番茄果实组织，需要 200μl IEF 缓冲液。

(2) 样液需要在室温条件下振荡至少 1h（有时需要更长时间）。不要加热样品，否则会导致蛋白质的氨基甲酰化（carbamylation）。

(3) 定量时，需要一些用 IEF 缓冲液稀释卵清蛋白（ovalbumin）标准液（8 份稀释液，分别从 0μg/μL 到 60μg/μl）。然后，在每份稀释液中分别加入 10μl 0.1mol/L HCl。

最后，无论用于制作标准曲线还是用于样品浓度测定的样品管，都用蒸馏水定容至 100μl。

(4) 然后加入 3.5ml 稀释的染色剂，并在 595nm 读出样液的吸光值。

测定植物组织中的蛋白质浓度，考马斯亮蓝法[9]比 Lowry 法[10]及 Biuret 法更合适，因为后两者都是基于定量酚类化合物[1]。但是，由于 IEF 缓冲液成分的干扰，不易在样品缓冲液中直接定量。因此，我们采取改良的 Ramagli 和 Rodriguez 法[11]，它基于样品缓冲液的酸化处理，即使缓冲液里含有尿素、载体两性电解质（carrier ampholytes）、非离子去垢剂和硫醇类化合物，仍可用于直接定量溶于样品缓冲液里的蛋白质。

2.4 注　　释

(1) 注意：β-巯基乙醇和 PMSF 是有毒化合物。PMSF 可制成溶于异丙醇中的 200mmol/L 贮备液，分装保存在－20℃条件下。

(2) 不要加太多的水溶解 CHAPS 和尿素粉末，如 25ml 终体积，约 10ml 水即可。准备此溶液时，避免加热到 30℃以上，防止蛋白质的氨基甲酰化。溶解时间比较长。

(3) 染色剂稀释要根据 Bio-Rad 说明手册中进行准备。

(4) 得到研磨充分的粉末是非常重要的。研磨得越充分，蛋白质的提取和除去掉污染物的效果就越明显。为了精确地进行样品比较，粉末要研磨均匀。

(5) 这一步骤特别注意保持低温以抑制蛋白酶活性。

(6) Tris 饱和苯酚要根据生产商说明来准备，并贮存在 4℃。在容器中，苯酚密度大于 Tris 溶液。一次性吸出所需体积的苯酚，以避免两相相互混溶。

(7) 这里有一个小技巧，就是在提取缓冲液中加入蔗糖，使两相位置发生改变。

(8) 在－80℃贮藏充分干燥的蛋白质沉淀，以延缓沉淀再次溶解的可能。恢复到室温时，置于真空干燥器中以防止蛋白质再水化。

参考文献

1. Michaud, D. and Asselin, A. (1995) Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A* **698,** 263–279.
2. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., and de Vienne, D. (1988) Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophoresis* **2,** 263–340.
3. Hurkman, W. J. and Tanaka, C. K. (1986) Solubilisation of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81,** 802–806.
4. Mijnsbrugge, K. V., Meyermans, H., Van Montagu, M., Bauw, G., and Boerjan, W. (2000) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* **210,** 589–598.
5. Mihr, C. and Braun, H. P. (2003) Proteomics in plant biology, in *Handbook of Proteomics* (Conn, P., ed.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 409–416.
6. Carpentier, S. B., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., and Panis, B. (2005) Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* **5,** 2497–2507.

7. Wang, W., Scali, M., Vignani, R., et al. (2003) Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. *Electrophoresis* **24,** 2369–2375.
8. Saravanan, R. S. and Rose, J. K. C. (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* **4,** 2522–2532.
9. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.
10. Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265–275.
11. Ramagli, L. S. and Rodriguez, L. V. (1985) Quantification of microgram amounts of protein in two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6,** 559–563.

第3章　谷类植物种子蛋白质提取

Cerard Branlard 和 Emmanuelle Bancel

摘要　种子中可能含有不同的成分，像淀粉和多糖，它们会严重降低蛋白质的提取量。谷类植物种子中的蛋白质据其溶解性通常分为 4 类：白蛋白（albumin）、球蛋白（globulin）、醇溶蛋白（prolamin）和谷蛋白（glutelin），它们可以分别提取出来。本章描述一种从绿色种子或未成熟的谷类植物子粒中提取蛋白质的方法。改良了多个步骤以提取以下蛋白质：①所有的贮藏蛋白质（大部分的醇溶蛋白和谷蛋白）；②用盐缓冲液提取白蛋白-球蛋白；③使用相分配法提取两性蛋白质；④强力吸附于或含于种子胚乳淀粉粒的蛋白质。这些方法已经成功应用于双向电泳和蛋白质组学分析。

关键字　种子；白蛋白；球蛋白；两性蛋白质；贮藏蛋白；淀粉

3.1　前　言

从种子中提取蛋白质一般没有太多困难。但是，要想成功提取，这一步就要格外小心，因为种子并不是一种组织构成。不同物种的种子成分有很大差异。受精后，细胞分裂产生不同的组织，如胚乳、胚、胚盘、子叶、糊粉层及种皮，每一种组织都有不同的生化成分。像大多数的植物组织，种子也含有不同的成分，这些成分会严重地减少蛋白质的提取量，或者严重干扰蛋白质在双向电泳中的分离。种子的外层通常由半纤维素、木酚素、多酚及阿拉伯木聚糖构成。多种植物的细胞壁都是由阿拉伯木聚糖，阿拉伯半乳聚糖构成。种子一般可看成各种成分的贮藏所，其中一些组织能够富集多糖、脂质及许多次生代谢物，这些组织通常蛋白质含量少，蛋白酶类却很多[1]。要成功提取种子中的蛋白质，在溶解蛋白质进行电泳分析时[2]，要根据一定的原则，避免双向电泳中的异常变化，如垂直拖尾（vertical streaking）、弥散、可辨认蛋白质点的数量减少等。对于谷类植物种子来讲，主要的贮藏成分是淀粉和复合碳水化合物（图 3-1），这些物质会对蛋白质的提取带来不便。

种子中存在的许多蛋白质，通常能根据它们在不同溶剂中的溶解度分为 4 类，这些溶剂依次加入，用于提取不同蛋白质[3]。在研磨成粉末的种子中，白蛋白是水溶性蛋白质，而球蛋白必须加入 NaCl 溶液提取。相对于谷类植物子粒中的贮藏蛋白质，这些蛋白质都是可溶的。白蛋白和球蛋白在谷类植物种子中分别占全部蛋白质含量的 10%，在豆科植物中占全部蛋白质含量的 85%以上[4]。贮藏蛋白质首先分为醇溶蛋白和谷蛋白。这两种蛋白都是疏水性的，常聚集在液泡里或者形成蛋白质体。醇溶蛋白，如麦醇溶蛋白、大麦醇蛋白、玉米醇蛋白、燕麦醇蛋白和水稻醇蛋白（分别来自小麦、大麦、

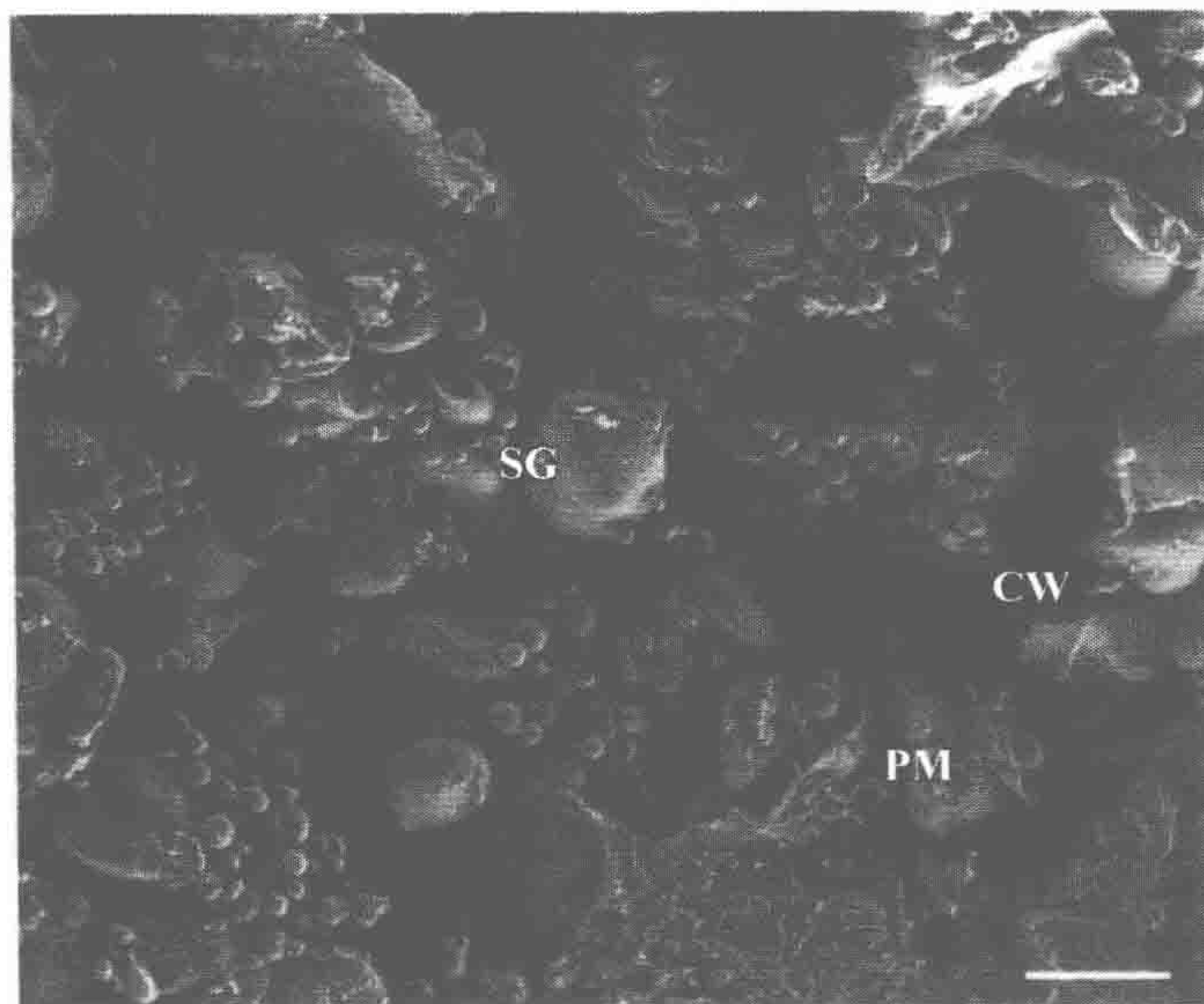


图 3-1 成熟的小麦种子的电子显微镜扫描图（F. E. I. Co，Eindoven，Holland）
图中显示淀粉粒（SG）被蛋白质层（PM）不同程度地包围；细胞壁（CW）。谷类植物胚乳的结构可能使从蛋白质层中完全提取蛋白质变得困难。标尺＝20μm（照片由 Gaillard-Martinie B. INRA. 友情提供）

玉米、燕麦和水稻）都是单体且溶于 70％的乙醇。谷蛋白（小麦中的谷蛋白）通常是聚合在一起的，并可以用含有还原剂的酸性溶剂提取出来。两种贮藏蛋白（醇蛋白和麦谷蛋白）都富含脯氨酸和谷氨酰胺，归为醇蛋白类[5]，其他特殊溶剂现在也被用于提取贮藏蛋白[6-8]。

因为植物物种不同，并非所有种子中的蛋白质都可以被全部提取。选择一种提取方法时，往往要考虑多种因素。因为蛋白质不是种子中的主要成分，它们常和其他成分聚集或结合到一起，如细胞壁物质或者是淀粉粒，或者由于研磨颗粒粗糙而使蛋白不易溶解出来。后者在谷类植物中至关重要，因为谷类植物的遗传因素可以影响籽粒中胚乳的坚硬度，并由此影响是否能够研磨充分。种子是否能充分而一致地研磨会直接影响蛋白质提取的重复性。种子中的水分也会影响研磨后的均一程度，所以所有的材料在取样时需要保持恒定的湿度。此外，种子即使是纯合体且基因型一致，由于所在穗、荚和花序上等的位置不同，其年龄可能并不相同。举例来说，在一棵小麦穗上，中部到末梢所有花受精需要 2～3 天，结果造成籽粒的大小不同，组织中蛋白质成分含量也不同。

下面介绍一些用于提取蛋白质的经典方法。分两类：①普适方法，这种方法是用合适的提取缓冲液提取种子中主要的蛋白质；②这种方法更加适用于谷类植物蛋白质，可以分别提取 4 种蛋白质，另外还有一种淀粉粒中的蛋白质。

3.2 材　　料

所有的化学药品都为分析纯。

3.2.1 用于提取种子总蛋白的普适方法

(1) 提取液：10% (V/V) 三氯乙酸用预冷丙酮稀释，0.07% (V/V) β-巯基乙醇丙酮溶液和 0.4% (V/V) 植物蛋白酶抑制剂 (Sigma、Steinheim、Germany，cat. no. P9599)。这种溶液叫三氯乙酸/丙酮提取液，-20℃保存。

(2) 漂洗液：沉淀蛋白质在预冷丙酮中漂洗，丙酮里加入和上述提取液一样的成分，但是不加三氯乙酸，-20℃保存。

(3) 溶解液：7mol/L 尿素，2mol/L 硫脲，4% (m/V) 3- [3- (胆酰胺丙基) 二甲氨基] 丙磺酸内盐 (CHAPS)，2% (m/V) 二硫苏糖醇 (DTT)，0.4% (V/V) 蛋白酶抑制剂 (Sigma)，1% (V/V) 载体两性电解质 pH3～10 和 1% (V/V) 载体两性电解质 pH6～9.5 [或 4～7、或 6～11，根据等电聚焦 (IEF) 步骤中 IPG 条梯度] (见注释 1 和注释 2)。

(4) 烷化剂：4-乙烯基吡啶 (Aldrich，cat. no. V3，40-4)。

(5) 甘油溶液：60% (V/V) 甘油用水稀释，加入痕量溴酚蓝。

(6) 蛋白质浓度测定：用考马斯亮蓝法 (bradford assay) (Sigma，cat. no. B6916) 或 2D Quant 试剂盒 (Amersham，cat. No. 80 6483 56)，用牛血清白蛋白 (BSA) 作为蛋白质标准品。

3.2.2 特殊蛋白质的提取

1. 白蛋白和球蛋白

(1) 磷酸钠缓冲液：50mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.8；0.1mol/L NaCl 含有 0.4% (V/V) 蛋白酶抑制剂 (Sigma)。可以在 4℃保存 4 周。

(2) 透析：透析用 Slide-A-lyzer 透析暗盒，7K MWCO，0.1～0.5ml 容量 (Pierce，www.piercenet.com)。

2. 两性蛋白质

(1) Tris-HCl 缓冲液：0.1mol/L Tris、5mmol/L EDTA、0.25mol/L NaCl 用 HCl 调至 pH7.8。保存在 4℃条件下数周。

(2) Triton X-114 溶液：加 2% (V/V) Triton X-114 和 0.4% (V/V) 蛋白酶抑制剂 (Sigma) 到 Tris-HCl 缓冲液。这种 Triton 溶液应该在使用前准备。

(3) 沉淀液：1 体积二乙醚和 3 体积乙醇，在使用之前在通风橱里准备好。

3. 淀粉粒蛋白质

整个操作流程都使用去离子水。

（1）密度梯度：90%（*V*/*V*）氯化铯（CsCl，Prolabo）。

（2）漂洗液：4%（*m*/*V*）CHAPS和2%（*m*/*V*）DTT。

3.3　方　　法

3.3.1　种子总蛋白提取的普适方法

使用普适方法的目的在于从研磨好的种子中提取总蛋白质，不考虑具体的蛋白质种类。此方法由Damerval等[9]及Granier[10]提出，它可以用于所有的种子，参见第1章。这种方法不仅特别适用于从绿熟种子中提取蛋白质，也适用于从早期形成阶段的谷类植物籽粒，种皮、胚或正在发育的胚乳中提取蛋白质。一些特殊组织，如糊粉层、胚和胚乳能够从发育中的籽粒及成熟的籽粒中分离出来。不像分离胚那样容易，分离糊粉层需要时间和经验，要在显微镜下剖开很多种子才能得到足够的材料用于蛋白质提取和双向电泳。

一株植物上收获到的种子存在差异，所以要从有代表性的穗、花序、荚等收集未成熟的种子。

根据所使用的方法，即在溶解之前沉淀（见下文）或直接溶解（见下文），在蛋白质提取量或者在双向电泳凝胶上的蛋白质图谱会有所不同。不管怎样，一旦应用了一个方法，整个实验就必须采用此方法的操作流程。

1. 在溶解之前沉淀

来自穗、花序、荚等的绿熟材料收集后立即称重。这些绿熟种子材料研磨之前冷冻。

（1）将研磨后的粉末（100mg）立即加入1ml预冷的TCA/丙酮提取缓冲液（见注释3～5）。过夜沉淀后在15 000*g*，4℃离心15min。

（2）沉淀用漂洗液洗两次，每次洗后在15 000*g*，4℃离心15min。弃去上清（见注释6）。

（3）将从100mg材料中得到的沉淀晾干，以去掉残留的丙酮，然后保存在－80℃（见注释7）。这种方法可使蛋白质在被1250μl溶解剂或者被含有如离液剂（chaotrope）和去垢剂等特殊溶剂的IEF缓冲液溶解之前而高度浓缩。

2. 直接再溶解

种子中的蛋白质可以直接从研磨过的籽粒中提取，而不必先用TCA/丙酮提取和沉淀。用去垢剂和离液剂直接从天然组织中提取蛋白质比从沉淀中提取蛋白质更有效，而且这种方法可以防止蛋白质沉淀或者重悬不完全而造成的丢失。这里描述的方法不包含使用预冷丙酮进行的沉淀，尽管预冷丙酮在浓缩蛋白质及除去盐和其他有机化合物上很有用。这种丙酮沉淀方法直到最近才被提出[11]。另一种最近被报道的方法是从发育的小麦子粒中用KCl增进溶解的方法提取蛋白质[12,13]。大麦中的蛋白质首次用5mmol/L

Tris-HCl，pH7.5 及 1mmol/L $CaCl_2$ 被提出[14,15]。含有各种蛋白酶抑制剂、DNA 酶Ⅰ、RNA 酶、Triton X-100 和 DTT 的硫脲/尿素裂解缓冲液被用于拟南芥种子[16]。这里描述的方法主要适用于谷类植物胚乳蛋白的提取，这种蛋白质主要由贮藏蛋白（醇溶蛋白和谷蛋白）组成。这种方法不能排除其他蛋白质，特别是许多白蛋白和球蛋白也和贮藏蛋白一起被提取出来。

(1) 材料在收集后要立即称重，然后碾碎（见注释 8 和注释 9）或磨碎（见注释 10）。

(2) 将 500μl 溶解液加入已有 40mg 材料粉末的离心管中，涡旋混合，在室温中孵育 1.5h。

(3) 超声处理（20W、20s）之后，将悬浊液放置 30min 后离心（9000*g*、5min、20℃）。然后收集 250μl 上清液。上清液主要含贮藏蛋白。

(4) 用考马斯亮蓝法（Bradford[17]）（Sigma）或 2D Quant 试剂盒（Amersham）测定蛋白质浓度。

(5) 将 20μl 载体两性电解质（根据 IEF 步骤中 IPG 条梯度要求选用）和 4μl 4-乙烯基吡啶（见注释 11）加入到 250μl 上清液中。涡旋混合 15min，再加入 254μl 甘油溶液。−80℃保存直到使用。

3.3.2　特定蛋白质的提取

1. 白蛋白和球蛋白

同时提取两种蛋白质（水溶性白蛋白和盐溶性球蛋白）已经优化应用于等电聚焦。因此，用磷酸钠缓冲液提取蛋白质后[18]得到的蛋白质先脱盐、沉淀，然后重悬于等电聚焦缓冲液中。最近，用这种方法在双向电泳中成功分离小麦籽粒中的白蛋白和球蛋白[19]。根据 3.3.1 节 2 中描述的方法或是在注释 8～10 中描述的方法碾磨种子（包括种皮、带胚或不带胚）。蛋白质提取根据以下步骤完成。

(1) 将 100mg 材料粉末加入 1ml 磷酸钠缓冲液中，在 4℃ 持续搅拌 2h。离心（8000*g*、10min、4℃），然后取 500μl 上清液（见注释 13）。

(2) 根据生产商说明，用冷水在 4℃透析 24h（见注释 14）。

(3) 除去盐分的样液与 1ml 丙酮混合，在−20℃反应沉淀一夜，然后离心（8000*g*、4℃、5min）。

(4) 除去上清液，将蛋白质沉淀用预冷丙酮漂洗 3 次，每次漂洗后离心（8000*g*、4℃、5min）。沉淀蛋白质风干后除去残留的丙酮。

(5) 将沉淀溶于 250μl 溶解缓冲液中，其间涡旋几次（见 3.2.1.）。室温下 1.5h 后，溶解的蛋白质再用超声处理（20W、20s），将悬浊液静置 30min，离心（9000*g*、5min、20℃），收集上清液。

(6) 收集含有蛋白质的上清液，并补充 20μl 载体两性电解质和 4μl 4-乙烯基吡啶。溶液进行涡旋处理，静置 15min。

(7) 加入 254μl 甘油。溶液在进行双向电泳分析之前，一直保存在−80℃（见注

释12）。

2. 两性蛋白质

这种蛋白质由两种形式的氨基酸序列组成，一种序列富含亲水的氨基酸（大部分为Lys、Arg和His），另一种序列富含疏水的氨基酸（如Val、Leu和Ile）。大部分膜蛋白都是两性的。这里描述提取方法基于与其他方法做适当改良[20]，便于从小麦种子中提取两性蛋白质[21,22]。

(1) 籽粒按照前述方法研磨（见注释8～10）。

(2) 取250mg粉末加于7.5ml Triton X-114溶液中，在4℃搅拌1h，并在10 000*g*，4℃离心30min。

(3) 上清液在37℃加热45min进行相分配，然后在5000*g*、22℃离心10min。小心除去上层轻相（见注释15）。

(4) 将5体积沉淀液（大约10ml）加入富含两性蛋白质下层相。在－20℃沉淀过夜。

(5) 在2000*g*，－8℃条件下离心10min后，沉淀用10ml二乙醚乙醇溶液漂洗3次，每次漂洗后在2000*g*，－8℃条件下离心10min。

(6) 最后，沉淀用5ml二乙醚漂洗、离心，在室温下真空干燥。干燥后的沉淀保存在－80℃备用。等电聚焦时，将干燥的沉淀溶解于250μl溶解液中（见3.2.1）。

3. 淀粉粒蛋白质

淀粉是谷类植物籽粒胚乳中的主要成分（占干重的70%～75%）。源于造粉体的淀粉粒随着种子的形成在成熟的胚乳中积累。在谷类植物种子中，淀粉粒大小分布不同（图3-1）。以下介绍的方法用于提取谷类植物子粒中吸附在淀粉粒上或存在于淀粉粒中的蛋白质。这种方法是在关于小麦淀粉中的淀粉合酶研究的基础上修改形成的[23,24]。

(1) 在室温条件下，用研钵和杵捣碎1～2个半籽粒，并将磨碎的组织从种皮组织中分离出来（见注释16）。

(2) 将40～60mg粉末在1ml去离子水中4℃浸泡过夜。将悬浊液在10 000*g*，4℃离心2min。

(3) 然后将300μl冷水加入沉淀上，并涡旋混合。

(4) 悬浊液中加入1ml 90%（*V/V*）CsCl进行分层，在4℃静置5min，然后在14 000*g*，4℃离心5min。小心除去上清液。

(5) 然后把1ml含有CHAPS和DTT的漂洗液加在沉淀上。涡旋混合，在37℃加热15min，并每隔5min涡旋一次。悬浊液在14 000*g*，4℃离心3min，小心除去上清液。

(6) 将淀粉粒沉淀离心（参数同前）并用水漂洗3次，方法如下：加1ml水在沉淀上，涡旋悬浊液，室温静置5min，然后在14 000*g*，4℃离心3min。每次都小心除去上清液。

(7) 最后用预冷丙酮漂洗5min，涡旋，离心同步骤（6）。晾干淀粉粒沉淀，称重，

并保存在－20℃备用。

(8) 以 1∶5 (m/V) 的比率用漂洗液重悬淀粉粒沉淀。通常，40mg 干燥淀粉沉淀可在室温下，涡旋悬浮于 200μl 新配制的含有 4% (m/V) CHAPS 和 2% (m/V) DTT 的溶液中（见注释 16）。将悬浮液静置 5min，100℃加热 5min，可使淀粉粒释放其内含物。

(9) 将悬浊液在冰中冷却 10min，并在 17 000g，4℃离心 15min。上清液中含有强力吸附于淀粉粒上或存在于淀粉粒中的蛋白质。收集的蛋白质可以被保存在－80℃或直接用于双向电泳。在进行等电聚焦时，需要将 150μl 的溶解液（见 3.2.1）加入到 100μl 上清液中。

3.4　注　　释

(1) 最常使用的还原剂是 DTT，不过选择还原剂要根据样品特点，所以三丁基膦 (TBP) 也可使用[25]。

(2) 溶液应该在使用前准备，或者分装保存在－80℃。

(3) TCA 能够强烈影响蛋白质折叠和沉淀，阻止蛋白质的溶解。因此在提取缓冲液中不用 TCA。

(4) 20mmol/L DTT 可以用来代替 0.07% 2-巯基乙醇作为还原剂。

(5) 推荐使用植物蛋白酶抑制剂。它的使用可以使一些材料在零上温度条件下进行涡旋和超声处理（20W、20s）。

(6) 尽管 TCA/丙酮方法可以使蛋白质浓缩，但要想让低分子质量的蛋白质沉淀下来，则需要更高标准的离心参数（如 30 000g、4℃离心 30min）。

(7) 蛋白质沉淀可以晾干并在－80℃保存，或者不进行保存直接进行再溶解。

(8) 当用绿熟材料或绿熟籽粒时，可以先用液氮冷冻，之后用研钵和杵在液氮中捣碎。

(9) 材料也可以被冻干并保存在－20℃直到用于分析。

(10) 若样品是成熟的谷类植物籽粒，籽粒可用 Cyclotec 14920 磨粉机（Tecator、Hoganas、Sweden）配上 0.75mm 网筛研磨。粉末必须立即提取蛋白。

(11) 自由巯基的烷化可以用 2-碘乙酰胺代替 4-乙烯基吡啶。烷化通常只在 IEF 之后在 IPG 胶条平衡步骤中完成。巯基烷化后，贮藏蛋白的亚基将会更好地分离。

(12) 甘油溶液优先考虑在杯中上样，此外，在等电聚焦之前的水化过程中一直存在。在有些等电聚焦分离过程中可以除去甘油溶液，如白蛋白和球蛋白的分离。

(13) 白蛋白或是其他水溶性蛋白可以用预冷蒸馏水直接提取，如拟南芥的种子[16]。

(14) 由于丙酮沉淀可以除去盐分，所以透析步骤可省略，特别是当少量蛋白质用于 IEF 时。当需要大量 ($>$150μg) 蛋白质上样时，透析可以除去提取液中干扰物质，避免第一向等电聚焦水平拖尾。

(15) 相分配可以使两性蛋白质富集到下层高密度相中。轻相应该小心地移出，因

为发现许多蛋白质存在于较轻相和较重相的中间。

（16）淀粉粒能够从1～2个或者更多的无胚籽粒中被分离出来。此外，种子可以被切割成半并保留用于形成幼苗的胚部分。用于提取存在于淀粉粒中或强力吸附于淀粉粒上的蛋白质的淀粉粒的量可高于40mg。这个量对于用银染2-DE凝胶检测小麦淀粉粒中的主要蛋白质是足够的。最近在大麦上采用了类似的方法[26]。这个量对于小麦淀粉粒而言，用银染的方法足够能检测到它所包含的主要蛋白质。

参 考 文 献

1. Tsugita, A. and Kamo, M. (1999) 2D Electrophoresis of plant proteins. *Methods Mol. Biol.* **112,** 95–97.
2. Rabilloud, T. (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis* **17**, 813–829.
3. Osborne, T. B. (1907) The proteins of the wheat kernel. *Publication of the Carnegie Institution, Washington,*Washington, DC.
4. Gueguen, J. and Lemarie, J. (1996) Composition, structure et propriétés physico-chimiques des proteins de légumineuses et d'oléagineux, in *Protéines Végétales* (Godon, B. E., ed.), Lavoisier, Paris, pp. 80–119.
5. Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., and Miflin, B. J. (1986) The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *J. Cereal Sci.* **4,** 97–106.
6. Marion, D., Nicolas, Y., Popineau, Y., Branlard, G., and Landry, J. (1994) A new improved sequential extraction procedure of wheat proteins, in *Wheat Kernel Proteins-Molecular and Functional Aspects.* Universita Degli Studi della Tuscia Consiglio Nationale delle Ricerche, pp. 197–199.
7. Fu, B. X. and Kovacs, M. I. P. (1999) Rapid single-step procedure for isolating total glutenin proteins of wheat flour. *J. Cereal Sci.* **29,** 113–116.
8. Landry, J., Delaye, S., and Damerval, C (2000) Improved method for isolating and quantitating α-amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins, and true glutelins in maize endosperm. *Cereal Chem.* **77,** 620–626.
9. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7,** 52–54.
10. Granier, F. (1988) Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **9,** 712–718.
11. Islam, N., Tsujimoto, H., and Hirano, H. (2003) Proteome analysis of diploid, tetraploid and hexaploid wheat: towards understanding genome interaction in protein expression. *Proteomics* **3,** 549–557.
12. Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Cai, N., Wong, J. H., Buchanan, B. B., and Hurkman, W. J. (2005) Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* **5,** 1594–1611
13. Wong, J. H., Cai, N., Balmer, Y., et al. (2004) Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches. *Phytochemistry* **65,** 1629–1640.
14. Østergaard, O., Melchior, S., Roepstorff, P., and Svensson, B. (2002) Initial proteome analysis of mature barley seeds and malt. *Proteomics* **2,** 733–739.

15. Østerggard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., and Svensson, B. (2004) Proteome analysis of barley seeds: identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4-7). *Proteomics* **4,** 2437–2447.
16. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., et al. (2001) Proteomic analysis of arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiol.* **126,** 835–848.
17. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.
18. Nicolas, Y., Martinant, J. P., Denery-Papini, S., and Popineau, Y. (1998) Analysis of wheat storage proteins by exhaustive sequential extraction followed by RP-HPLC and nitrogen determination. *J. Sci. Food Agric.* **77,** 96–102.
19. Majoul, T., Bancel, E., Triboi, E., Ben Hamida, J., and Branlard, G. (2004) Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics* **4,** 505–513.
20. Blochet, J. E., Kaboulou, A., Compoint, J. P., and Marion, D. (1991) Amphiphilic proteins from wheat flour: specific extraction, structure and lipid binding properties, in *Gluten Proteins 1990* (Bushuk, W. and Tkachuk, R., eds.), American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN, pp. 314–325.
21. Branlard, G., Amiour, N., Igrejas, G., et al. (2003) Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3,**168–174.
22. Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P., and Branlard, G. (2002) Proteomic analysis of amphiphilic proteins of hexaploid wheat. *Proteomics* **2,** 632–641.
23. Zhao, X.C. and Sharp, P.J. (1996) An improved 1-D SDS-PAGE method for the identification of three bread wheat "waxy" proteins. *J. Cereal Sci.* **23,** 191–193.
24. Marcoz-Ragot, C., Gateau, I., Koenig, J., Delaire, V., and Branlard, G. (2000) Allelic variants of granule-bound starch synthase proteins in European bread wheat varieties. *Plant Breeding* 119, 305–309.
25. Skylas, D. J., Mackintosh J. A., Cordwell, S. T., et al. (2000) Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat-grain endosperm. *J. Cereal Sci.* **32,** 169–188.
26. Borel, M., Larsson, H., Falk, A., and Jansson, C. (2004) The barley starch granule proteome-internalized granule polypeptides of the mature endosperm. *Plant Sci.* **166,** 617–626.

第4章 木质部和韧皮部汁液蛋白质提取

Julia Kehr 和 Martijin Rep

摘要 众所周知，高等植物体内木质部和韧皮部的维管负责长距离运输营养小分子。但是人们并没有预计到这两种运输汁液中也存在蛋白质，对于这些蛋白质的功能没有深入地研究。本章中将要描述如何从木质部和韧皮部的汁液中提取及提纯蛋白质进行蛋白质组学分析。

关键词 木质部汁液；韧皮部汁液；蛋白质沉淀；蛋白质组学

4.1 前　　言

高等植株的维管束可以运输营养物质，可使相距遥远的植物各部分之间进行交流。这些维管束包含两种运输单元，即木质部和韧皮部。木质部的主要功能是运输水及营养物质到达地上部分；韧皮部用于分配有机同化物，如糖和氨基酸，从生产源运输到植物体的其他部分。在不同植物的木质部和韧皮部的汁液中都发现了蛋白质。

尽管木质部细胞是死细胞，但在健康的和受病原体侵染的植物体中的木质部汁液仍含有低浓度的蛋白质，并且这些蛋白质具有特殊的功能，如用于维护、重建及强化细胞壁，或者用于防御病原体[1-5]。

构成韧皮部的运输管道称为筛管分子（SE）。筛管分子是高度特化的细胞，它没有细胞核和核糖体，因此筛管分子没有转录和翻译的功能。筛管中运输的液体一般被称为韧皮部汁液。在不同植物的韧皮部汁液里，已经发现了100多种蛋白质[6]。有一定数量的蛋白质已经被鉴别出来[7-11]。这些蛋白质可能是通过特殊的胞间连丝从紧密联系的伴胞（CC）中运输过来[12]。相对于木质部汁液，韧皮部汁液中的蛋白质浓度达到了一个相当高的水平（葫芦中高达60mg/ml）[13]。认为这种蛋白质在韧皮部的维护和防御上起到了一定作用，有些可能在长距离通信上起重要作用[7,10,11,14]。

本章描述如何获得木质部和韧皮部汁液，并如何从中提取蛋白质用于蛋白质组学研究。

4.2 材　　料

4.2.1 收集木质部汁液

(1) 刀片。

(2) 螺旋盖试管。

(3) 用于收集木质部汁液的容器和冰。

4.2.2　浓缩木质部汁液蛋白质

(1) 用 Amicon Centriprep YM-3 离心超滤浓缩器和（或）Amicon Centricon Plus-20 离心超滤管过滤装置过滤，并对木质部汁液蛋白质进行部分提纯。

(2) 沉淀蛋白质，在100%丙酮中加入12.5%TCA并在使用前加入β-苯巯基乙醇（每40ml含35μl β-苯巯基乙醇）或用80%丙酮沉淀。

4.2.3　收集韧皮部汁液

(1) 消过毒的刀片或皮下注射针头。

(2) 滤纸。

(3) 用于收集韧皮部汁液的移液管、反应管和冰。

4.2.4　提纯韧皮部汁液蛋白

(1) 2mol/L HCl。

(2) 2mol/L NaOH（分析纯）。

(3) 丙酮/甲醇/DTT [90% (*V/V*)/10% (*V/V*)/10mmol/L]；100%丙酮（分析纯）。

4.3　方　　法

4.3.1　收集木质部汁液

木质部汁液属于植物细胞外空间，含有的特殊蛋白质的种类和浓度随植物的状态而变化。因为纯净的木质部汁液容易从大多数植物中得到，所以容易用蛋白质组学工具进行木质部汁液蛋白质的鉴别。准备进行单向电泳（1-DE）或双向电泳（2-DE）分离的蛋白质样品时，要考虑到蛋白浓度很低，且含有低聚糖（及糖基化蛋白）。用1-DE或2-DE进行木质部汁液蛋白质样品分析，有两个基本步骤，即收集木质部汁液和浓缩蛋白质。

(1) 用刀片切割植物的茎，收集从根侧茎中自然流出的汁液（由于根压流出）（图4-1）。植物的茎可以在任何高度被切割，不过通常来讲，切割部位离茎基部越近，流出的汁液量越大。但是茎的切口要达到一定高度（大约10cm）以便连接一个放在冰中的管子（见注释1）。

(2) 汁液收集。

a. 将剩下的茎段水平放置，把一根管子接在切口处。管子放在一个装有冰块的容器中，然后收集汁液达6h（图4-1C；在汁液收集的过程中，容器冰块需补充；见注释2）。

b. 另一种方法是，渗出的木质部汁液可以每隔几分钟用移液管重复收集，液体收集到放置在冰块上的反应管里。

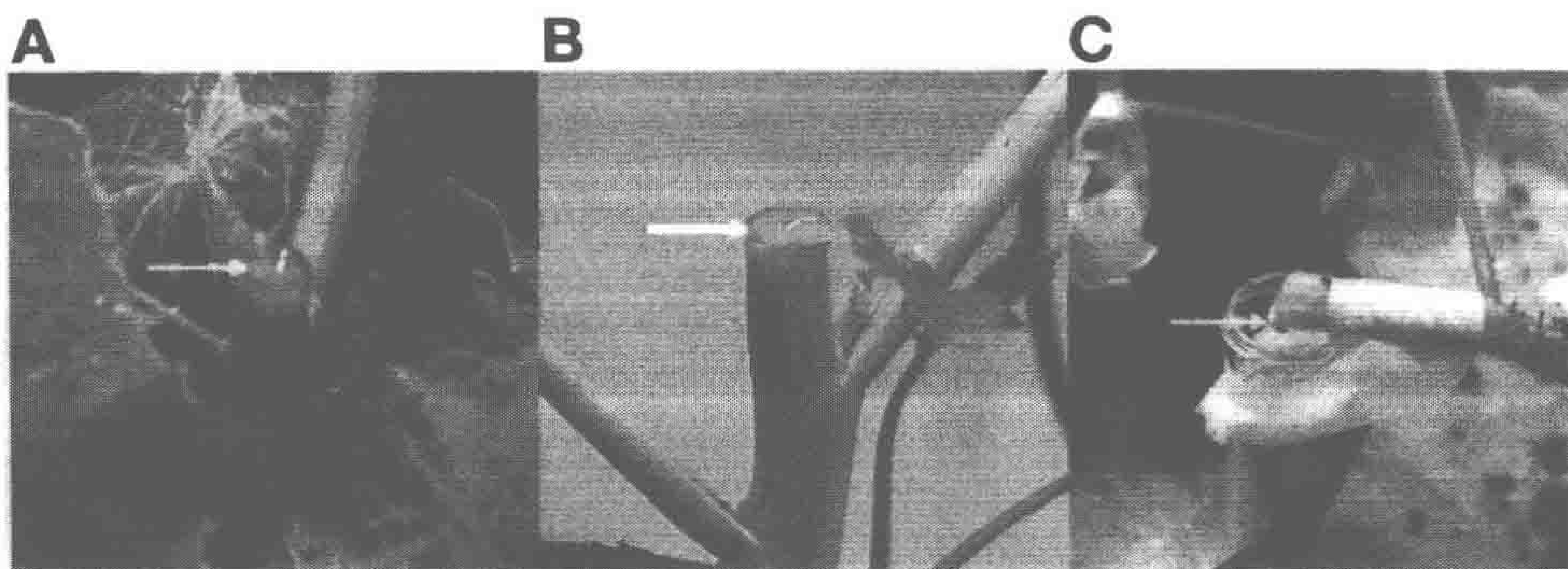


图 4-1　茎切割后根压使黄瓜（A）、芸苔（B）、番茄（C）植株木质部汁液渗出
茎的切口大约在土地表面 10cm 高度，清洗之后收集从茎切口渗出的汁液

（3）收集汁液前要清洗切口，以除去被切细胞的细胞质和切割韧皮部时直接流出的汁液（见注释 3）。

（4）在浓缩蛋白质前，可以用离心的方法除去颗粒状物质，像土壤颗粒、微生物细胞或残留的组织。

4.3.2　浓缩木质部汁液蛋白

木质部汁液不但含有蛋白质，也包含碳水化合物（见注释 4）和其他化合物，如氨基酸、盐及多酚（在被病原体侵染的植株中）[15-17]。

如果进行 1-DE，简单的蛋白质沉淀就可以，甚至可以用乙醇（4 份 95%乙醇/5% 0.1mol/L NaAc 加入 1 份蛋白质样品中），尽管乙醇也可以沉淀多聚和低聚糖。

如果进行等电聚焦，汁液应该用 Amicon 过滤装置进行部分提纯和浓缩，之后用 TCA/丙酮进行沉淀。

1. 用 Amicon 过滤装置进行蛋白质的部分提纯和浓缩

用 Amicon Centriprep YM-3 离心超滤浓缩器（最多 15ml，自动开关：3kDa）和（或）Amicon Centricon Plus-20 离心超滤管（更大的容积，自动开关：10kDa）过滤装置，对木质部汁液进行浓缩及部分提纯。

（1）离心后除去微粒状物质，将最多 15ml（Amicon Centriprep YM-3）或者 19ml（Amicon Centricon Plus-20）木质部汁液加入样品容器中。

（2）在 4℃、3000*g* 旋转 Amicon Centriprep YM-3 75min 直到达到平衡（过滤收集器里外液面之间）。

（3）在 4℃旋转 Amicon Centricon Plus-20，4000*g*，15min。轻轻倒出滤液，再加入 19ml 木质部汁液到样品过滤杯中。

（4）再旋转 15min。

（5）轻轻倒出滤液，如果需要进一步浓缩，则重复旋转和倒出滤液的步骤。

（6）直接从 Centriprep YM-3 中收集浓缩液（至少 500μl）。

(7) 在1000g旋转倒置部分(inverted unit) 5min，从Centricon Plus-20收集浓缩液(至少200μl)。

2. 用TCA/丙酮沉淀蛋白质

(1) 将4份100%丙酮溶液(含12.5%TCA和0.0875%β-巯基乙醇)加入1份蛋白质中，并混合。

(2) 在−20℃反应45min以上(或用80%丙酮在0℃反应1～4h)，然后用离心机的最快速度离心30min(不需冷冻)。

(3) 弃掉上清液，并用冰冷的100%丙酮漂洗沉淀3次。

(4) 除去残留液体，室温晾干沉淀。沉淀可溶于重悬缓冲液(2mol/L硫脲、7mol/L尿素、4%CHAPS、2%mmol/L DTT)[5]后用于等电聚焦，或保存在−20℃。

4.3.3 收集韧皮部汁液

韧皮部汁液比木质部汁液更难从大部分植物体中收集。因此，韧皮部汁液蛋白组学的主要难题是收集足够多的材料。不过，可根据不同植物物种的特性应用不同的采集方法。

对于一些植物物种(如蓖麻、葫芦科植物、丝兰)，切小切口[8]或割开整个植物器官[18]可以收集韧皮部汁液。不适宜这种收集方法的植物可以通过EDTA辅助分泌法[19-21]取样。许多植物都可以用蚜口针技术[22]得到高纯度的韧皮部汁液，但是量很少。

已经被确立的模式植物，像拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)或是水稻(*Oryza sativa*)，很难采集到足够量的筛管分子渗出液用于蛋白质组研究。对于拟南芥而言，可得到的样品量不足以用于蛋白质组学的研究方法[10]，对于水稻而言，只有一些高丰度的韧皮部汁液蛋白质能够通过planthopper口针渗出液[6,23]被鉴别出来。大部分目前关于鉴别韧皮部多肽的信息来自于葫芦[8]、蓖麻[10]，最近又从油菜[7]得到了相关信息。收集这些植物的韧皮部汁液要相对容易。两种版本的渗出技术(exudation technique)描述如下所述。

1. 版本1

(1) 用刀片切割植物的主茎或叶柄(图4-2)。

(2) 将注射针头穿刺植物体(见注释5)。

2. 版本2

(1) 切割后使用地上部分一侧的断茎，用滤纸吸干切口(见注释6)。

(2) 用滤纸吸去最先渗出的液滴。

将随后渗出的汁液吸取收集到一个保存在冰中的反应管(见注释7)。

4.3.4 韧皮部汁液蛋白质的提纯

(1) 在1-DE或2-DE中分离韧皮部蛋白质时，必须考虑到运输液中的高浓度糖和

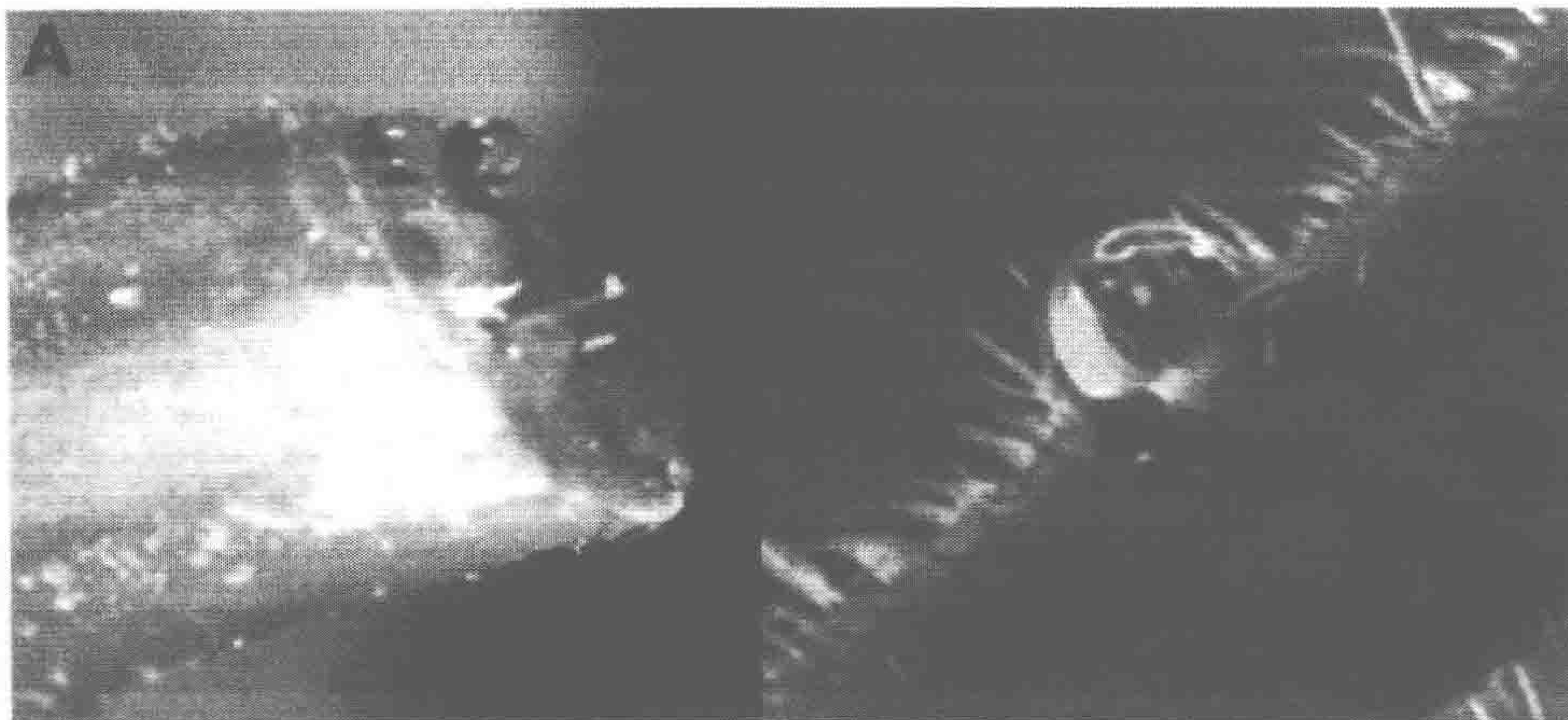


图 4-2　用渗出技术从黄瓜植株中提取韧皮部样液

茎用刀片（A）或注射针头（B）切割。渗出的汁液（在用滤纸吸去第一滴）在冰浴中收集。注意（A）图中带切口的地上部分一侧的茎用于韧皮部汁液收集，根侧茎用于收集木质部汁液

有机物。另外，植物对切割有御伤机制，其中包括蛋白质聚合作用[24]。

（2）对于 1-DE 来说，韧皮部样液可以被直接加进 1-DE 样品缓冲液[25]，加热，并在室温下进行凝胶电泳。

（3）对于 2-DE，在样液用于进行等电聚焦电泳之前，蛋白质应该通过沉淀的方法提纯。

1. 去除韧皮部主要的蛋白质 1（PP1）和蛋白质 2（PP2）

两种主要的韧皮部蛋白质——韧皮部丝状蛋白 PP1 和韧皮部凝集素 PP2 存在于所有双子叶植物中，并在一些植物中占全部韧皮部蛋白质的 50%以上（如葫芦科植物）。在氧化条件下，两种蛋白质通过二硫键形成不溶性聚合物[26,27]，它们会在 1-DE 和 2-DE 中形成拖尾，使分辨率下降。要移除这些蛋白质，可以使用先酸化再中和的方法[28]。以下的所有步骤都在室温下完成。

（1）用 2mol/L HCl 标定样液到 pH 2.0。

（2）用 2mol/L NaOH 中和样液到 pH 7.5。

（3）在 15 000*g* 离心 15min。

（4）收集上清液并去掉含有 PP1 和 PP2 的大量白色沉淀（见注释 8）。

2. 用丙酮/甲醇/DTT 沉淀全部韧皮部汁液蛋白质

要移除碳水化合物和其他干扰成分，可以用丙酮/甲醇/DTT 处理使蛋白质沉淀。

（1）加入 3 倍体积预冷沉淀液。

（2）在－20℃沉淀一夜（见注释 9）。

（3）在 6800*g*、4℃离心 5min（见注释 10）并丢掉上清液。

（4）用 100%预冷丙酮漂洗沉淀物两次，并在 6800*g*、4℃离心 5min。

（5）除掉上清液，室温晾干沉淀 5～10min（见注释 11）。

（6）将沉淀在样品缓冲液中被溶解，用于 1-DE 和 2-DE（见注释 12）。

4.4　注　　释

（1）因为木质部汁液中含有蛋白酶，所以要注意样液必须时刻保持低温状态；可以使用蛋白酶抑制剂。

（2）番茄植株在汁液流出 6h 后，汁液量会发生很大变化。从健康的、6～7 周大的一株植株中可以得到多于 10ml 的汁液，但是偶尔从一株植株会取不到任何汁液或者很少量的汁液。植物生长的条件会明显影响汁液的获取量，不过我们还没有发现能够影响汁液获取量的特定条件究竟是什么。从染病的植物中只能得到较少量的汁液。如被维管萎蔫病真菌（尖孢镰刀菌）侵染了的植物。

（3）蛋白质或糖分的浓度可以被用于测量被韧皮部污染的程度；若木质部中两种物质浓度低，说明木质部汁液纯度高。

（4）多聚和寡聚糖可以和普通试剂反应来测量蛋白质浓度，像考马斯亮蓝和二喹啉甲酸（BCA，Sigma）。它们在木质部汁液中会导致对蛋白质含量估算偏高。

（5）活体植株中，筛管分子膨压为正，导管分子内膨压为负，所以只有韧皮部汁液可以从这种切口中获得。

（6）要牢记从切断的茎的有茎叶一侧取得韧皮部汁液，从另一侧（有根一侧）取得木质部汁液。

（7）因为韧皮部汁液通常含有高浓度蛋白酶抑制剂，所以不需要加入化学蛋白酶抑制药剂。

（8）完成沉淀步骤后，检查蛋白质组成（如通过用 1-DE 分析蛋白质沉淀的组成）是很重要的。因为不单是 PP1 和 PP2，其他的蛋白质也会在这个过程中被沉淀。

（9）不要延长沉淀的时间，延长时间会使蛋白质变成不溶性的。

（10）用更高的速度离心会带来溶解问题。

（11）不要通过真空离心干燥，因为这会导致溶解性变差。

（12）如果沉淀不溶解，孵育更长时间，超声处理或在更高的温度下孵育也许会有效。如果仍有不溶部分存在，在进行凝胶电泳之前离心样品。

参考文献

1. Rep, M., Dekker, H. L., Vossen, J. H., et al. (2003). A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. *FEBS Lett.* **534,** 82–86.
2. Rep, M., Dekker, H. L., Vossen, J. H., et al.. (2002). Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol.* **130,** 904–917.
3. Sakuta, C. and Satoh, S. (2000). Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber. *Plant Cell Physiol.* **41,** 627–638.

4. Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C., Kehr, J. (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219**, 610–618.
5. Kehr, J., Buhtz, A. and Giavalisco, P. (2005). Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biol.* **5,** 11.
6. Fukuda, A., Okada, Y., Suzui, N., Fujiwara, T., Yoneyama, T., and Hayashi, H. (2004). Cloning and characterization of the gene for a phloem-specific glutathione S-transferase from rice leaves. *Physiol. Plant.* **120,** 595–602.
7. Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A., and Kehr, J. (2006). Towards the proteome of *Brassica napus* phloem sap. *Proteomics* **6,** 896–909.
8. Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J., and Kehr, J. (2004). Proteomics of curcurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* **65**, 1795–1804.
9. Haebel, S. and Kehr, J. (2001). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry peptide mass fingerprints and post source decay: a tool for the identification and analysis of phloem proteins from *Cucurbita maxima* Duch. separated by two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* **213,** 586–593.
10. Barnes, A., Bale, J., Constantinidou, C., Ashton, P., Jones, A., and Pritchard, J. (2004). Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *J. Exp. Bot.* **55,** 1473–1481.
11. Hayashi, H., Fukuda, A., Suzui, N., and Fujimaki, S. (2000). Proteins in the sieve element-companion cell complexes: their detection, localization and possible functions. *Aust. J. Plant Physiol.* **27,** 489–496.
12. Lucas, W. J. (1999). Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.* **50,** 979–987.
13. Kehr, J., Haebel, S., Blechschmidt-Schneider, S., Willmitzer, L., Steup, M., and Fisahn, J. (1999). Analysis of phloem protein patterns from different organs of *Cucurbita maxima* Duch. by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectroscopy combined with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Planta* **207,** 612–619.
14. Yoo, B.-C., Lee, J.-Y., and Lucas, W. J. (2002). Analysis of the complexity of protein kinases within the phloem sieve tube system. Characterization of *Cucurbita maxima* calmodulin-like domain protein kinase 1. *J. Biol. Chem.* **277,** 15,325–15,332.
15. Iwai, H., Usui, M., Hoshino, H., et al. (2003). Analysis of Sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol.* **44,** 582–587.
16. Heizmann, U., Kreuzwieser, J., Schnitzler, J.-P., Brüggemann, N., and Rennenberg, H. (2001). Assimilate transport in the xylem sap of pedunculate oak (*Quercus robur*) saplings. *Plant Biol.* **3**, 132–138.
17. Lopez-Millan, A. F., Morales, F., Abad'a, A., and Abad'a, J. (2000). Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* **124,** 873–884.
18. Alosi, M. C., Melroy, D. L., and Park, R. B. (1988). The regulation of gelation of phloem exudate from *Cucurbita* fruit by dilution, glutathione, and glutathione reductase. *Plant Physiol.* **86,** 1089–1094.
19. King, R. and Zeevaart, J. (1974). Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol.* **53,** 96–103.

20. Hoffmann-Benning, S., Gage, D. A., McIntosh, L., Kende, H., and Zeevaart, J. A. D. (2002). Comparison of peptides in the phloem sap of flowering and non-flowering Perilla and Lupine plants using microbore HPLC followed by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Planta* **216,** 140–147.
21. Marentes, E. and Grusak, M. A. (1998). Mass determination of low-molecular-weight proteins in phloem sap using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *J. Exp. Bot.* **49,** 903–911.
22. Kennedy, J. and Mittler, T. (1953). A method of obtaining phloem sap via the mouth parts of aphids. *Nature* **171,** 528.
23. Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., et al. (1995). Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195,** 456–463.
24. Clark, A. M., Jacobsen, K. R., Bostwick, D. E., Dannenhoffer, J. M., Skaggs, M. I., and Thompson, G. A. (1997). Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, Phloem Protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* **12,** 49–61.
25. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.
26. Read, S. M. and Northcote, D. H. (1983). Chemical and immunological similarities between the phloem proteins of three genera of the Cucurbitaceae. *Planta* **158,** 119–127.
27. Read, S. M. and Northcote, D. H. (1983). Subunit structure and interactions of the phloem proteins of Cucurbita maxima (pumpkin). *Eur. J. Biochem.* **134,** 561–569.
28. Christeller, J. T., Farley, P. C., Ramsay, R. J., Sullivan, P. A., and Laing, W. A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* **254,** 160–167.

第5章　木本植物蛋白质提取

Christophe Plomion 和 Céline Lalanne

摘要　在这一章内，我们将介绍一种从木材形成的组织（分化中的次生木质部）中提取总蛋白的方案。这套方案被用于一系列的阔叶植物（橡树和白杨）和针叶植物（松树）的植物器官（根、叶、花粉、芽、花、形成层和韧皮部）。蛋白质首先在液氮中用TCA-丙酮方法从粉末状组织中提取出来溶解在缓冲液中。2D凝胶实验结果可参见：http://cbi. labri. fr/outils/protic/index. php.

关键词　总蛋白提取；双向聚丙烯酰胺凝胶电泳；木材；树

5.1　前　　言

在多年生植物中，维管形成层产生次生木质部组织而形成了一种独特组织，称为木材[1]。木材由疏导分子和非疏导分子组成，用于水和营养物质在树木中的长距离运输（参见 Ecotree 站点可获得更多信息 http://www. botany. uwc. ac. za/ecotree/）。在裸子植物中，木材主要由两部分组成：管胞和木射线薄壁细胞。在被子植物中，木材同样包含维管束和纤维。这也是一种高度可变的材料。维管形成层的活动和新分裂细胞的分化通常受到环境和个体发育的影响，并最终影响木材特性。

木材在生物圈中贮存大气中过多的 CO_2，在我们日常生活中是众多产品的原材料，也是一种用之不尽的可再生资源。可是关于木材形成过程知之甚少。木材形成是一种复杂的现象，由很多基因协同控制，特别是关于多糖、木质素和细胞壁蛋白生物合成和装配的一些基因[2]。到目前为止，对于木材形成方面的分子机制研究主要通过转录组方法进行，结合 EST 测序以及转录组数据[3-6]。关于这方面的大规模转录组研究只有一项：从分化的海岸松的次生木质部组织中鉴定蛋白质[7]。

本章描述从 3 种森林树种木材形成组织中成功提取蛋白质的方法，即松树、白杨和橡树。这种方法也被成功应用于其他器官上，即根、叶、花粉、芽、花、形成层和韧皮部。双向电泳凝胶的结果可参见：http://cbi. labri. fr/outils/protic/index. php。

5.2　材　　料

5.2.1　组织的采样和贮存

1. 木材形成组织

(1) 首先用 30cm 刀片的刮树皮器切割下外表粗糙的树皮。

(2) 用锋利的小刀在暴露的组织上切出一个切口（横两刀、竖两刀），剥离韧皮部和形成层。

(3) 用蔬菜剥皮器或小刀从被剥离的原木表面采集正在分化的木质部（木材形成组织），并立即在液氮中冷冻。－80℃保存用于蛋白质提取。

(4) 样品要从生长季节生长的成年树木上采集（图5-1）。不同形式的木材（早材和晚材、幼龄材和成材、对应区和应压区木材）[1]化学成分、解剖学结构和物理特性不同，可从同一株提取。

2. 其他组织

为了获得植株不同组织或器官的蛋白质组表达图谱，以白杨为例进行说明，详见 http://cbi.labri.fr/outils/protic/PublicPopulus.php。需要从处于活跃生长期的幼苗或树木中采集叶、根、叶芽和花芽、花粉、韧皮部和形成层。

5.2.2　沉淀总蛋白质（见注释1）

(1) 聚碳酸酯10ml橡胶边缘旋盖圆底高速离心管（nalgene，rochester，NY）。

(2) 沉淀缓冲液（需要保存在－20℃的新鲜溶液）：含有10%TCA的溶液会让蛋白质有效地沉淀下来，并准备0.07% β-巯基乙醇丙酮溶液。

(3) 漂洗缓冲液（需要保存在－20℃的新鲜溶液）：0.07% β-巯基乙醇丙酮溶液。



图5-1　用小刀切割松树的正在分化的木质部

5.2.3 蛋白质溶解（注释 2）

溶解缓冲液：7mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、0.4% Triton X-100（见注释 3）、4% CHAPS、10mmol/L DTT、1% IPG 缓冲液（Amersham Bioscience，Uppsala，Sweden）（见注释 4）。保存在－20℃。

5.3 方　法

5.3.1 提取总蛋白质（见注释 5）

（1）将去塞的 10ml 空离心管称重。我们选用韧性好的聚碳酸酯旋盖圆底高速离心管。

（2）细胞碎裂：500mg 新鲜组织（保存在－80℃）在液氮中用研钵和杵捣成粉末状。

（3）用 8ml 预冷沉淀缓冲液将粉末再次溶解。

（4）将混合物转移到称重过的离心管中。

（5）用 2ml 预冷沉淀缓冲液漂洗研钵。

（6）将漂洗液也转移到离心管中。

（7）轻轻上下翻转离心管 15s 混合，然后让蛋白质在－20℃沉淀 1h。

（8）在 16 000*g* 离心 15min（见注释 6）。

（9）轻轻倒出离心管里的上清液。

（10）用 10ml 预冷漂洗缓冲液漂洗离心管中的沉淀（除掉残留的 TCA），并让离心管在－20℃反应 1h。

（11）在 16 000*g* 离心 10min（见注释 6）。

（12）真空干燥沉淀 2h。

（13）用玻璃棒将沉淀打碎成粉末状。

（14）连同干燥的沉淀一起称重离心管。

5.3.2 溶解蛋白质

（1）用溶解缓冲液将粉末重悬。每毫克粉末用 10～30μl 缓冲液溶解。这种缓冲液含有混合的离液剂（尿素、硫脲）、去垢剂（Triton-X 100，CHAPS）、还原剂（DTT）、载体两性电解质（IPG 缓冲液）。

（2）在室温，400*g* 离心 4min，去除不溶性物质（如细胞碎片）。

（3）将上清液倒入一支干净的离心管。

（4）在室温，400*g* 离心 4min，将上清液倒入一支干净的离心管。

（5）在－80℃保存上清液。

（6）根据 Ramagli 等[8]描述的方法，浓缩蛋白质可以用超过 6 次的重复定量实验。计算出平均浓度，每根 IPG 胶条上样 300μg 蛋白质。

5.4 注　　释

(1) 注意：因为这种提取缓冲液中含有毒成分，并有刺激性的气味，因此应该在通风橱中进行制备。

(2) 尿素和硫脲的溶解约需 30min。绝对禁止用加热的方法促进缓冲液溶解。可以用超纯水（18.2MΩ · cm 电阻率）配制缓冲液。

(3) 应先配制 20% Triton X-100 溶液，保存在 4℃备用。

(4) 根据等电聚焦步骤中选择的 IPG 胶条的 pH 梯度，选择合适的 IPG 缓冲液。

(5) 虽然此方案只有一次重复取样，但通常每个样品能够提取 3 次蛋白质，所有提取蛋白量能够进行 5 次双向电泳。

(6) 在离心之前离心机温度降到 0℃。

参 考 文 献

1. Lachaud, S., Catesson, A. M., and Bonnemain, J. L. (1999) Structure and functions of the vascular cambium *C. R. Acad. Sci. Paris* **322,** 633–650.
2. Plomion, C., Le Provost, G., and Stokes, A. (2001) Wood formation in trees. *Plant Physiol.* **127,** 1513–1523.
3. Allona, I., Quinn, M., Shoop, I., et al. (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 9693–9698.
4. Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., et al. (1998) Gene discovery in wood forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 13,330–13,335.
5. Hertzberg, M., Aspeborg, H., Schrader, J., et al. (2001) A Transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Nat. Acad. USA* **98,** 14,732–14,737.
6. Whetten, R., Sun, Y. H., Zhang, Y., and Sederoff, R. (2001) Functional genomics and cell wall biosynhesis in loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* 47**,** 275-291.
7. Gion, J-M., Lalanne, C., Le Provost, G., et al. (2005) The proteome of maritime pine wood forming tissue. *Proteomics* **5,** 3731–3751.
8. Ramagli, L. S. and Rodriguez, L. V. (1985) Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6,** 559–563.

第6章　拟南芥叶绿体蛋白质组学分析

Klaas J. van Wijk，Jean-Benoit Peltier 和 Lisa Giacomelli

摘要　本章介绍了一种简单实用的大规模分离纯化叶绿体的方法。本方法的优点是产量高、污染低并且蛋白质的降解少。分离出来的叶绿体样品适用于进行蛋白质组分析。

关键词　叶绿体；蛋白质；拟南芥；纯化

6.1　前　　言

叶绿体是绿色植物组织中一种重要的器官，其主要功能是执行光合作用。除此之外，许多重要的化合物也在叶绿体内合成，如植物激素、脂肪酸和油脂、氨基酸、维生素、嘌呤、嘧啶核酸、四吡咯类化合物及类异戊二烯等。叶绿体也是植物细胞内同化氮和硫的场所[1]。其内包含有大量的蛋白质结合伴侣、定位元件、辅因子伴侣、组装元件、肽酶及蛋白酶等，对于蛋白质生物合成和胞内平衡具有重要作用。叶绿体内的蛋白质种类多样，包括与质体 DNA 及 mRNA 结合的蛋白质，这些蛋白质对叶绿体内基因的表达具有重要作用[2,3]。据估计，与不同种类质体结合的蛋白质共计 2000～4000 种。其中约 550 种是含有 α 螺旋的跨膜蛋白或者膜结合蛋白[4]，而叶绿体基质则含有多于 1000 种的蛋白质。到目前为止，已经有许多研究对拟南芥类囊体和叶绿体膜蛋白质组进行了详细的探讨[5-13]。

本章介绍的叶绿体分离方法主要是基于 David Christopher 博士[14]以拟南芥为材料所发展出来的一种方法，同时还参考了一些已经发表的从豌豆和菠菜中分离叶绿体的方法[15]。在上述基础上，我们进一步优化了分离方法，并将其用于本实验室大规模的叶绿体分离和蛋白质组分析工作中[16]。这种方法没有进行过叶绿体蛋白质输入活性的测试，但是本方法具有产率高，污染低的优点，尤其适合于叶绿体的蛋白质组分析。关于用于体外蛋白质输入活性试验的叶绿体分离方法，可以参考其他的一些报道[17]。

6.2　材　　料

(1) 介质 A（匀浆缓冲液，见注释 1)：50mmol/L HEPES-KOH（pH 8.0）、330mmol/L 山梨醇、2mmol/L EDTA-Na_2（pH 8.0）、5mmol/L 抗坏血酸维生素 C、5mmol/L 半胱氨酸，0.05％牛血清白蛋白（BSA）（可以忽略以减少对最后所得样品的污染，见注释 1）。

（2）介质 B（清洗溶液）：50mmol/L HEPES-KOH（pH 8.0）、330mmol/L 山梨醇、2mmol/L EDTA-Na_2（pH 8.0）。

（3）介质 C（裂解液）：10mmol/L HEPES-KOH（pH 8.0）、5mmol/L $MgCl_2$、蛋白酶混合抑制剂（表 6-1）。

表 6-1　蛋白酶混合抑制剂

抑制剂	溶液 (mg/ml)	溶解介质	终浓度 (μg/μl)
Antipain	20	水	50（74μmol/L）
Bestatin	1	0.15mol/L NaCl	40（130μmol/L）
Chymostatin	20	二甲亚砜	20
E64[a]	20	50%乙醇	10
Leupeptin	1	水	5
Phoshporamidon	20	水	10
Pefabloc sc	100	水	50
Aprotinin	10	水	2

a 难悬浮

（4）100% PF-Percoll：0.8g PEG 8000、0.27g Ficoll 400 000，加 Percoll 至最终体积为 27.5ml。

（5）Percoll 梯度：PF Percoll（40%或 85%）、0.5mmol/L EDTA、50mmol/L HEPES-KOH（pH 8.0）、330mmol/L sorbitol。

（6）浓缩离心设备（包含 3kDa 过滤器，如 Millipore 公司的 Amicon 3kDa）

6.3　方　　法

建议在短日照条件下培养材料以诱导营养生长，并在照光的早期收取材料以提高获得完整叶绿体的产率。所以试剂应在收集材料之前准备好，并连同其他一些设备，如离心机转头及离心管等在冰箱或冰上冷却至 0～4℃。为避免叶绿体过多地暴露于光下或破碎，所有操作应尽可能在绿光下迅速完成。整个分离过程 30～40min 可以完成。

（1）在 10h 光照（23℃）/14h 黑暗（17℃）光周期条件下培养拟南芥材料 5～6 周，开花前收取叶片。

（2）配制所有溶液，并连同所有设备（包括离心机以及转头）一起冷却至 0～4℃。

（3）剪取植物叶片（见注释 2），并用蒸馏水清洗以确保没有土壤附着。

（4）按每 10g 材料加 100ml 匀浆缓冲液（介质 A）的比例将材料和预冷的缓冲液混和在带有利刃的搅拌机中研磨 3 次，每次 10s。

（5）匀浆液用双层尼龙布过滤（22μm，见注释 3）。

（6）滤液在 1300g 离心力下离心 3min，沉淀即为叶绿体粗提物。

（7）将叶绿体粗提物重新悬浮在尽可能小体积的介质 B 中（轻轻搅动液体让沉淀

悬浮）。将悬浮的粗提物置于 Percoll 非连续梯度（40%～85%，见注释 4）表面，用 swing-out（非固定转角）转头在 3750g 离心力下离心 10min。

（8）用尖头吸管从 40%与 85%Percoll 的界面处收集完整的叶绿体，加入介质 B 以稀释 Percoll，直至叶绿素浓度为 1～3mg/ml（见注释 5）。然后在 1200g 的离心力下离心 3min，所得沉淀即为完整的叶绿体。

（9）要继续分离类囊体和基质蛋白，则加入裂解液轻轻地悬浮叶绿体沉淀，至叶绿素浓度为 1～3mg/ml。悬浮液置于冰上 5～10min，让叶绿体吸水膨胀并最终破裂释放出基质蛋白。也可以用微量研磨器对样品轻轻地稍加匀浆以更好地破碎叶绿体，注意研磨不能用力，以免破坏类囊体。

（10）10 000g 离心力下离心 20min，所得上清液即为基质蛋白抽提物，沉淀即为类囊体。为更好地去除污染，上清液需要在 300 000g 的离心力下继续离心 25min（参见注释 6）。

（11）用含有 3kDa 过滤器的离心浓缩器浓缩基质蛋白。裂解液中各种盐离子浓度均比较低，与各种样品缓冲液（如等电聚焦缓冲液、SDS 缓冲液、蓝绿或无色非变性胶缓冲液以及用于蛋白酶解的缓冲液）均能兼容。

（12）类囊体部分重新悬浮在相同的裂解液中，并进行色素和蛋白质定量。后续的蛋白质组分析需要用有机溶剂（如 70%丙酮）或离子（SDS）与非离子（OGG、DM）变性剂去除其中所含的色素（叶绿素和胡萝卜素）以及脂溶性分子（如质体醌）。最近的一些有关叶绿体膜蛋白组的分析可以参考文献［7，8，10，11，18，19］。

6.4 注　　释

（1）制备 1L 介质 A：60.1g 山梨醇、50ml 1mol/L HEPES-KOH 贮存液（pH 8.0）、4ml 0.5mol/L EDTA（灭菌贮存液），加双蒸水至最终体积 1 L。使用前新鲜加入 0.88g 抗坏血酸维生素 C、0.6g 半胱氨酸和 0.5g BSA（可以忽略以降低对最终叶绿体样品的污染）。

（2）一般 40～50 株完全生长的拟南芥植物材料须用 1L 研磨缓冲液。最佳的比例和研磨时间根据不同的实验室和操作者根据各自的经验确定。

（3）尼龙布在使用前最好用研磨缓冲液浸湿。

（4）Percoll 非连续密度梯度制备，直接在 85%Percoll 表面慢慢注入 40%Percoll，或者用移液管在 40%Percoll 下面注入 85%Percoll 即可。

（5）叶绿素浓度测定参照文献［20］进行。将 2～5μl 叶绿体或类囊体溶液加入 1ml 80%冰上预冷的丙酮中，振荡后在暗处于冰上静置 10min。4℃条件下 15 000g 离心 5min。收集绿色上清液部分，测定其在 663.2nm 及 646.8nm 处的吸光值。叶绿素 a 浓度＋叶绿素 b 浓度（μg/ml）＝（1＋v）/v×（7.15×$A_{663.2}$＋18.71×$A_{646.8}$）。

（6）也可以直接在 300 000g 条件下离心 25min，然后收集类囊体和包膜结构。但是在这种离心力下得到的沉淀难以重新悬浮，同时，高离心力可能会导致囊腔和一些外膜蛋白流失到基质蛋白部分。

致谢

感谢 David Christopher 博士为我们提供了初始制备方法。

参考文献

1. Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. L., eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
2. Monde, R. A., Schuster, G., and Stern, D. B. (2000) Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* **82,** 573–582.
3. Barkan, A. and Goldschmidt-Clermont, M. (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82,** 559–572.
4. Sun, Q., Emanuelsson, O., and van Wijk, K. J. (2004) Analysis of curated and predicted plastid subproteomes of *Arabidopsis*. Subcellular compartmentalization leads to distinctive proteome properties. *Plant Physiol.* **135,** 723–734.
5. Kleffmann, T., Russenberger, D., Von Zychlinski, A., et al. (2004) The *Arabidopsis thaliana* Chloroplast Proteome Reveals Pathway Abundance and Novel Protein Functions. *Curr. Biol.* **14,** 354–362.
6. Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., et al. (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2,** 413–425.
7. Ferro, M., Salvi, D., Brugiere, S., et al. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **28,** 28.
8. Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., et al. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99,** 11,487–11,492.
9. Ferro, M., Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., et al. (2000) Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* **21,** 3517–3526.
10. Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* **279,** 49,367–49,383.
11. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., et al. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell* **16,** 478–499.
12. Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., et al. (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* **14,** 211–236.
13. Schubert, M., Petersson, U. A., Haas, B. J., Funk, C., Schroder, W. P., and Kieselbach, T. (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **277,** 8354–8365.
14. Hoffer, P. H. and Christopher, D. A. (1997) Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast psbD promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115,** 213–222.
15. Cline, K. (1986) Import of proteins into chloroplasts. Membrane integration of a thylakoid precursor protein reconstituted in chloroplast lysates. *J. Biol. Chem.* **261,** 14,804–14,810.

16. Peltier, J. B., Ripoll, D. R., Friso, G., et al. (2004) Clp protease complexes from photosynthetic and non-photosynthetic plastids and mitochondria of plants, their predicted three-dimensional structures, and functional implications. *J. Biol. Chem.* **279,** 4768–4781.
17. Aronsson, H. and Jarvis, P. (2002) A simple method for isolating import-competent *Arabidopsis* chloroplasts. *FEBS Lett.* **529,** 215–220.
18. Seigneurin-Berny, D., Rolland, N., Garin, J., and Joyard, J. (1999) Technical advance: differential extraction of hydrophobic proteins from chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant J.* **19,** 217–228.
19. Gomez, S. M., Nishio, J. N., Faull, K. F., and Whitelegge, J. P. (2002) The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 46–59.
20. Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* **148,** 350–382.

第7章　植物线粒体制备及其亚结构分级分离

Holger Eubel，Joshua L. Heazlewood 和 A. Harvey Millar

摘要　植物细胞线粒体执行着一系列重要的生化过程。其中最重要的就是通过三羧酸循环（TCA）氧化降解有机酸的反应。这一反应过程中发生了一系列经由电子传递链的电子传递反应，同时生成 ATP。除此之外，线粒体还具有许多其他重要的功能，如核酸、氨基酸、脂质及维生素等有机化合物的合成，从胞质中通过其膜上蛋白复合体输入蛋白质及代谢物，感受细胞外信号（如氧化环境），影响植物细胞的程序性死亡等。线粒体含有自身的遗传物质 DNA，因此，其内也能发生转录和反应等生化过程。要想全面准确地阐明线粒体的产生、功能及其与细胞核之间的信号交换机制，就必须对线粒体的蛋白质构成有比较详细的了解。分离线粒体并对分析其蛋白质组在线粒体发育和应答外界环境信号过程中的变化的工作已有进行。本章主要提供一种从植物不同组织中分离线粒体，并对线粒体进行保存和纯度测定的方法。同时，提供了对线粒体膜结构以及基质内可溶性蛋白质进行分级分离的方法。最后所得的样品适合于进行线粒体蛋白质组分析。

关键词　细胞分级分离；Percoll 密度梯度；内膜；外膜；基质；膜间隙

7.1　前　　言

植物线粒体通过产生 ATP 为植物细胞提供能源。同时，它产生的三羧酸能为植物细胞的氮同化作用以及氨基酸合成提供充足的前体物质。有关线粒体在植物发育、生殖、育性、病敏感性及细胞程序性死亡等生理过程中的作用已有大量研究。据估计，植物线粒体内包含有 1000～1500 种蛋白质。迄今为止，已经通过蛋白质组手段鉴定了几百种蛋白质的存在。在分离线粒体的过程中，必须避免使用超渗或低渗的缓冲系统，以免线粒体破裂或变形；同时还应注意避免其他细胞组分破裂后释放出对分离完整线粒体不利的有机物。这样才能尽可能地确保分离所得的线粒体维持其在植物体内的形状。有关线粒体分离纯化技术的综述[1-3]和论文[4-6]已有发表。分离纯化植物线粒体并对其进行分级分离，将为我们提供各种蛋白质和酶类在线粒体内的定位及活性的详细信息，对深入研究植物线粒体的产生、生物组分、代谢及运输过程具有重要意义。本章我们介绍一种经典的植物线粒体分离和纯度评估方法，同时还包括对线粒体 4 个不同部分进行分级分离的方法。

7.2 材　　料

7.2.1 植物材料

植物的任何组织都可以作为提取线粒体的材料，但是从线粒体提取的产率、纯度等方面考虑，某些特殊的植物组织更适合用于线粒体的分离。

（1）非光合的肉汁饱满的植物块根或块茎组织适合用于大规模的线粒体分离提取。但是相对产率较低（5～10kg 新鲜组织只能提取约 300mg 线粒体蛋白质，即 30～60μg/g鲜重）。这类植物主要有土豆、红薯、萝卜及甜菜等。

（2）黄化苗的各种组织，如胚轴、子叶、根及胚芽鞘，因为叶绿体少，酚类化合物也远低于绿色组织部分，用来提取线粒体时产率较高（100g 新鲜组织大概可以提取 20mg 线粒体蛋白质，即 200μg/g 鲜重），并且提取的线粒体功能完备。

（3）当需要研究线粒体在光合作用中的功能时，或者所要研究的植物没有丰富的贮存器官时，就只能选取植物的绿色组织（叶片或子叶）作为材料来提取线粒体了。一般采取去除叶绿素的提取方法（产率大约为 100μg/g 鲜重）。

一旦用于提取的组织确定之后，就要确保这些组织不被细菌和真菌污染，因为菌体可以和线粒体一起被分离纯化下来。可以用冷水清洗多次，或者更为严格的情况下可以用次氯酸钠溶液（14%*m*/*V* 的贮存液进行 20 倍稀释）表面灭菌 5min。所有材料在使用前需冷却到 2～4℃。

7.2.2 匀浆缓冲液

为保证产率，在收集并冷却好植物组织后，应该立即匀浆开始线粒体的提取。基本的匀浆缓冲液包括 0.3～0.4mol/L 的渗透物质（蔗糖或甘露醇）、2～5mmol/L 的四价阳离子螯合剂（EDTA 或 EGTA）、20～50mmol/L 碱性缓冲系统（MOPS、TES 或焦磷酸钠）、5～20mmol/L 还原剂（半胱氨酸、抗坏血酸盐、二硫苏糖醇或 β-巯基乙醇）。还原剂应在使用之前加入。渗透物质帮助维持线粒体结构，避免其在分离过程中膨胀并破裂；缓冲系统避免因液泡破裂而导致线粒体被酸化；EDTA 可以抑制磷酸脂酶和各种蛋白酶的活性，而还原剂则有助于避免制备过程中氧化剂带来的伤害。尽管这种基本的基质系统对于从块茎组织中提取线粒体足够有效，为了更好地保护线粒体，提高制备产率，常常建议在这种基质系统中再加入一些其他的化学物质。黄化苗组织及绿色组织常常需要加入 0.2%～1%（*m*/*V*）BSA 以去除游离脂肪酸，2%（*m*/*V*）聚乙烯吡咯烷酮（PVP）以去除多酚类化合物。这里列出我们常用的匀浆缓冲液的配方：0.4mol/L 甘露醇、5mmol/L EGTA、50mmol/L 焦磷酸钠-KOH（pH 7.8）、10mmol/L 半胱氨酸，0.5% BSA 和 1% PVP-40，适用于各种不同的组织。缓冲液可以使用前新鲜配制，也可以配好后贮存在 4℃或－20℃条件下。匀浆后过滤可用平纹纱布、Miracloth（Calbiochem，La Jolla，CA）或各种药用纱布。

7.2.3　清洗缓冲液

0.3mol/L 甘露醇、10mmol/L TES-KOH，pH 7.2，以及0.1%（*m*/*V*）BSA 作为一种广泛用于各种植物组织线粒体提取的清洗缓冲液，即可用来悬浮和清洗线粒体，同时也用来配制 Percoll 梯度溶液。

7.2.4　Percoll 梯度溶液

用 0.3mol/L 蔗糖或 0.3mol/L 添加 10mmol/L TES 的甘露醇，pH 7.2，0.1%（*m*/*V*）BSA 在使用当天配制 Percoll 梯度溶液（见注释 1、2、3）。如果要准备连续梯度，则必须使用密度梯度制备仪（图 7-1A）；可以直接使用注射器制备非连续梯度（图 7-1B）。

7.2.5　细胞色素氧化酶活性鉴定

（1）氧消耗测定法：O_2 电极，0.5mol/L Tris-HCl，pH 7.5，5mmol/L 细胞色素 C（氧化型），0.5mol/L 抗坏血酸钠，10%（*m*/*V*）Triton X-100，0.1mol/L KCN。

（2）分光光度计测定法：可见光分光光度计，PD10 脱盐柱，0.5mol/L Tris-HCl、pH 7.5，5mmol/L 细胞色素 C（还原型，见注释 4），10%（*m*/*V*）Triton X-100，0.1mol/L KCN。

7.2.6　线粒体各组分分级分离

不含 BSA 的清洗缓冲液（0.3mol/L 甘露醇、10mmol/L TES-KOH，pH 7.2）、2mol/L KCl 贮存液、低渗缓冲液（50mmol/L 蔗糖、2mmol/L EDTA、10mmol/L MOPS pH 6.5）、2mol/L 蔗糖、碳酸钠溶液（100mmol/L Na_2CO_3）以及微量匀浆器。

7.3　方　　法

在选好植物材料和匀浆缓冲液后，接下来关键的因素包括匀浆方法、缓冲液的pH、使用的缓冲液与植物组织之间的比例、研磨时间及温度等（见注释 5）。

7.3.1　匀浆

根据植物组织的不同可以采取不同的匀浆方法，或者几种匀浆法结合运用。

（1）直接用预冷的研钵和研槌进行匀浆。

（2）在烧杯中用 Moulinex 混合器匀浆 20～60s，或者用 Polytron 搅拌器在 50%的全速下搅拌 5 次，每次 2s。

（3）在陶瓷搅拌器中高速下搅拌 15s，或低速下搅拌 2 次，每次 15s。

（4）用商用蔬菜或水果榨汁机将块茎直接榨汁到 5×匀浆缓冲液中。

（5）直接用搓板在匀浆缓冲液中将材料搓碎。

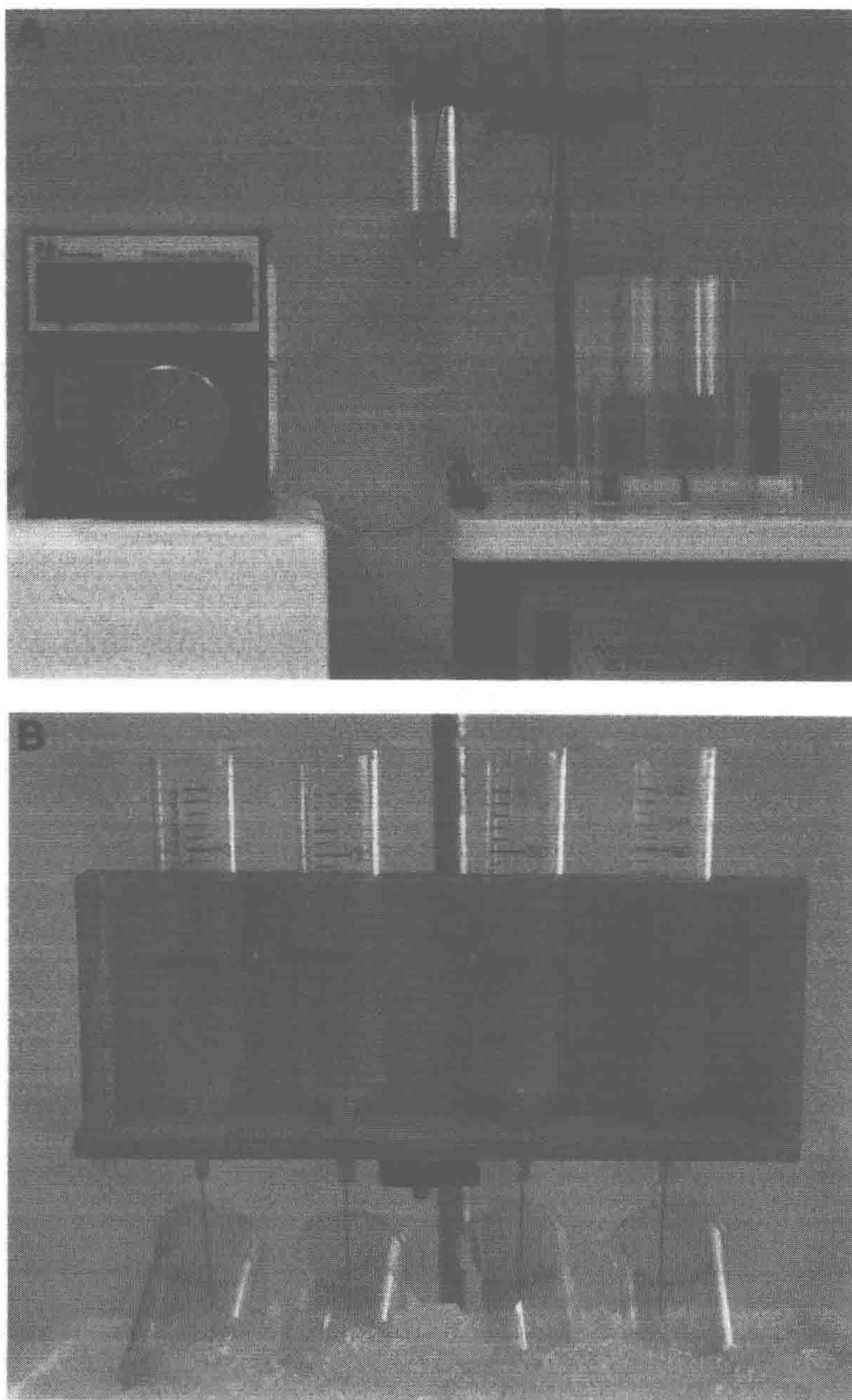


图 7-1　密度梯度制备

A. 连续密度梯度制备仪；B. 自制非连续密度梯度制备设施（见注释 3）

7.3.2　缓冲液 pH 以及与材料的比例

(1) 使用前匀浆缓冲液的 pH 必须调到 7.8 左右，以确保在细胞破碎后的整个系统 pH 仍能保持在 7.0～7.6。

(2) 对于某些特殊的植物组织，可能需要使用较多的匀浆缓冲液或者匀浆后使用 5mol/L KOH 或 NaOH 调节以保证最后的 pH 在 7.0 以上。

(3) 一般来讲，鲜重每克非绿色组织需用 2ml 匀浆缓冲液，每克绿色组织则需用 4ml。降低缓冲液的使用量会大大降低线粒体的提取效率。

(4) 在从块茎组织中提取线粒体时，使用较少的缓冲液也能有较高的提取效率，可能是因为该组织中酚类化合物含量较低的原因。

7.3.3　过滤及差速离心获得细胞器粗提物

(1) 匀浆液必须经过 4 层纱布在漏斗上过滤到烧杯或锥形瓶中，残留在纱布中的匀浆液可以直接拧到滤液中。过滤必须在 4～10℃条件下进行。

(2) 将滤液转移到预冷的离心管中（体积依滤液的多少而定，可以是 50ml、250ml 甚至 500ml)，然后在 1500*g* 下用固定转角的转头离心 5min。转头需预冷至 4℃。

(3) 所得沉淀为淀粉粒、核及细胞碎片。将上清液小心转移至新的离心管中，然后 18 000*g* 离心 15min。高速离心所得棕褐色或黄色或绿色沉淀即为含有各种细胞器的粗提物。

(4) 用 5～10ml 标准清洗液［如 0.3mol/L 甘露醇、10mmol/L TES-KOH、pH 7.2 和 0.1% (*m*/*V*) BSA］将细胞器粗提物重新悬浮。如果匀浆缓冲液中所用渗透介质为蔗糖，则 0.3mol/L 甘露醇 应改为 0.3mol/L 蔗糖。

(5) 将重新悬浮的液体转移至 50ml 的离心管中，用清洗液调整体积至 40ml 后 1000*g* 下离心 5min。

(6) 上清液转移至新的离心管中，18 000*g* 离心 15min。去掉上清液，沉淀用小量体积的清洗液重新悬浮均匀（见注释 6)。

7.3.4　密度梯度离心纯化线粒体

经上述步骤所得的线粒体可以用来进行呼吸效率的测定。但是根据其组织来源的不同，所得的线粒体常常混有类囊体或淀粉体膜、过氧化物酶体、乙二酸循环体、内质网及细菌，需要经过 Percoll 密度梯度离心进一步纯化。

(1) 将清洗过的线粒体溶液注入到 Percoll 梯度的表面，一般从 80g 黄化植物组织或 40g 绿色植物组织中提取的线粒体用 35ml Percoll 梯度溶液，使用 50ml 的离心管进行离心（见注释 2)。

(2) 35 000*g* 离心 45min，使用转角转头，降速时不设置“brake”减速。

(3) 离心后，线粒体呈浅黄色条带，位于绿色的叶绿体或黄色的质体膜条带之下（图 7-2)。用巴斯德吸管将线粒体部分吸出后（避免吸入质体）用 4 倍体积的标准清洗液稀释，然后 18 000*g* 离心 15min。

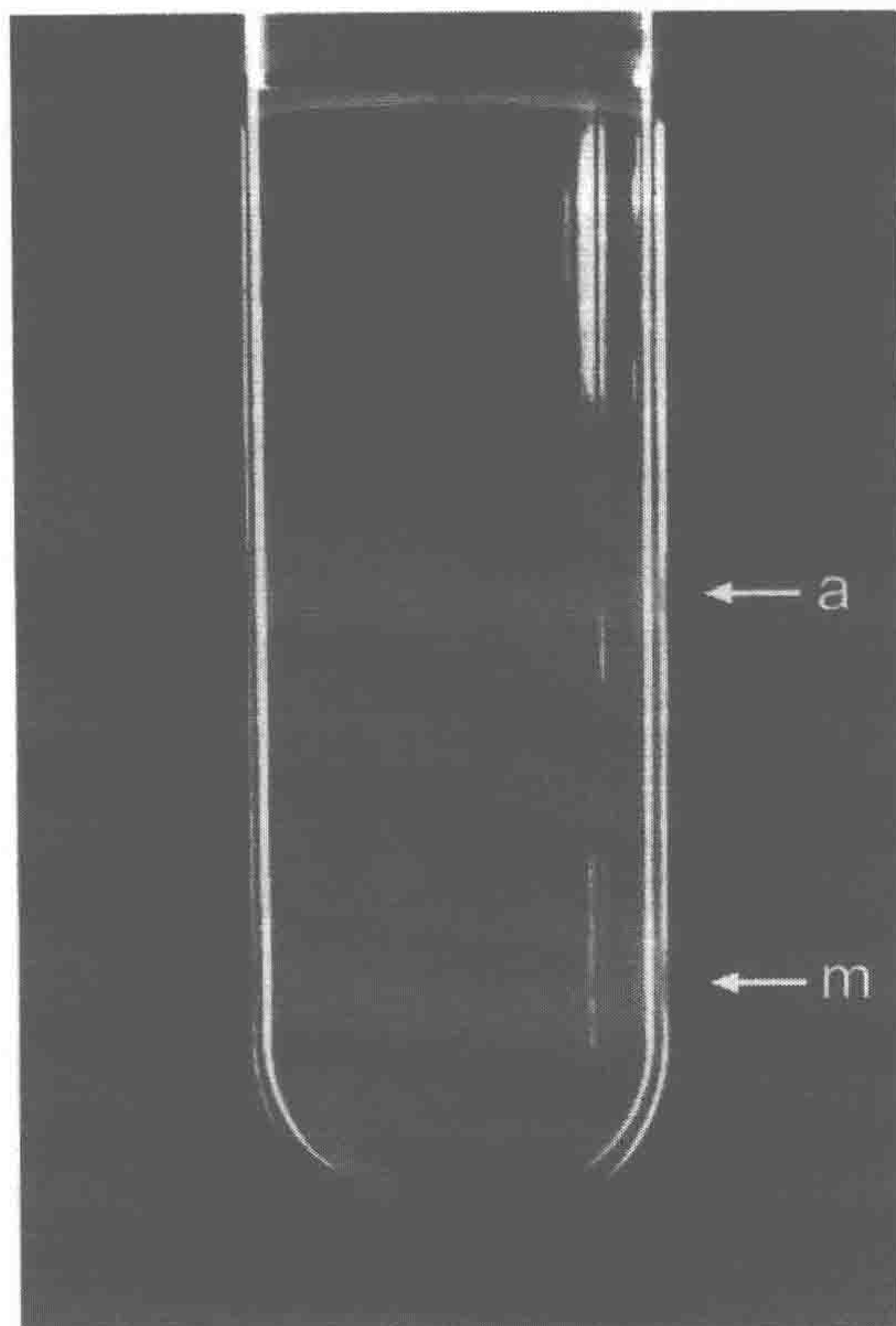


图 7-2 Percoll 密度梯度分离纯化植物线粒体

用 6ml 45%、18ml 26%和 14ml 14%的 Percoll 制备的非连续密度梯度提取土豆线粒体。在固定转角转头中用 70 000g 离心 40min 后，淀粉体外膜聚集在 14%与 26%的界面上（a），而线粒体则富集在 26%与 45%的界面处（m）。残余淀粉则在离心管底部形成沉淀。线粒体部分用巴斯德吸管在去掉上面的液体后小心吸取出来

（4）所得松软沉淀可再次用清洗液悬浮，并在同样速度下离心 15min。最后所得线粒体沉淀可按 5～20mg 线粒体蛋白/ml 清洗液（可用 Bradford 或 Lowry 法定量）重新悬浮溶解。

7.3.5 纯度鉴定

可以通过各种细胞器标志性酶的活性来确定线粒体的污染程度。过氧化物酶体可以鉴定过氧化氢酶、羟基丙酮酸还原酶或者乙二醇氧化酶的活性；叶绿体可以用叶绿素含量，白色体可以用类胡萝卜素的含量或碱性焦磷酸酶的活性；乙二醛循环体可以用异柠檬酸裂解酶的活性；内质网可以用对抗霉素 A 不敏感的细胞色素 C 还原酶；质膜可以用 K^+/ATPase 活性等来确定各种细胞器对线粒体的污染程度。经过仔细地密度梯度离心后，一般来自胞质的污染比较少，即使有污染，也可以通过测定乙醇脱氢酶的活性来确定。有关各种标志酶活性的测定方法可以参考文献［1］和文献［7］。其他线粒体纯

度相关事项可以参考注释 7。

7.3.6　线粒体完整性鉴定

分离出的线粒体可以通过各种方法来确定其结构的完整性。外膜的完整性通过其对外源细胞色素 C 的不通透性来确定。施加非离子变性剂（0.05%m/V Triton X-100）前后细胞色素 C 氧化酶活性的比值可以用来衡量线粒体的破裂比例。以下介绍两种经典且简单易行的酶活测定方法。

1. 氧气消耗速率

在一个细胞色素 C 可再生系统（保证稳定的底物浓度）中，使用氧电极即可测得氧气的消耗速率。

（1）在 20mmol/L 抗坏血酸中先测定氧气的消耗速率，然后在 25μmol/L 细胞色素 C 中测定氧气的消耗速率，接着加入 Triton X-100（0.05%）后测定氧气消耗速率，最后加入 1mmol/L KCN 停止反应。

（2）细胞色素 C 氧化酶活性定义为在细胞色素 C 和 Triton 存在条件下氧气的消耗速率减去加入 KCN 后的消耗速率（加入 KCN 后的氧气消耗速率通常和仅有抗坏血酸条件下测定的氧气消耗速率相同）。

（3）没加 Triton 前所得的酶活与加入 Triton 后所得的酶活的比值即可衡量线粒体破裂的比例。

2. 还原型细胞色素 C 的氧化

用分光光度计测量反应体系在 550nm 下吸光值的变化可以测定还原型细胞色素 C 的氧化程度。

（1）将线粒体蛋白加入到反应体系中（0.1mol/L Tris-HCl、25μmol/L 还原型细胞色素 C），在 550nm 下测定吸光值的变化速率，然后加入 0.05% Triton X-100 继续测定吸光值的变化速率。最后加入 1mmol/L KCN 停止反应。

（2）细胞色素 C 氧化酶的活性定义为在加入 KCN 之前的速率减去加入 KCN 之后的速率。

（3）同样没加 Triton 前所得的酶活与加入 Triton 后所得的酶活的比值即可衡量线粒体破裂的比例。

7.3.7　线粒体的贮存

制备的线粒体可以在冰上保存 5～6h 后仍然保持膜的完整性和呼吸活性。长期保存可以在加入 DMSO（终浓度 5%V/V）或乙二醇（7.5%V/V）后用液氮迅速冷冻保存于 −80℃数月。

7.3.8　线粒体各组分的分级分离

采用渗透胁迫加差速离心的方法可以将植物线粒体分级分离为 4 个组分：线粒体基

质（MA）、膜间隙（IMS）、内膜（IM）及外膜（OM）。

(1) 开始分级分离前，将线粒体样品盐洗一遍以去除一些非特异性结合在线粒体外膜的蛋白质：将5～10mg线粒体沉淀悬浮在4ml清洗液（不含BSA）中，加入2mol/L KCl至终浓度为200mmol/L。分装在2个2ml的离心管中，20 000*g*、4℃离心15min。

(2) 小心去掉上清液。用低渗缓冲溶液重新悬浮沉淀，并定量至6ml后转移到10ml的锥形瓶中，冰浴上搅拌15min（见注释8）。这一步操作使得线粒体膨胀，导致外膜破裂。也可以外加一定的机械剪切力（如用微量玻璃匀浆器）来增加对外膜的破碎。

(3) 向处理过的样品中添加0.9ml 2mol/L的蔗糖（约为1/8倍稀释蔗糖）后分装到2ml的离心管中，20 000*g*，4℃离心15min。

(4) 小心收取上清液（包含外膜小泡和膜间隙蛋白）冻存于－80℃。

(5) 去掉残存的上清液，然后将沉淀（mitoplasts）重新悬浮在2ml 250mmol/L的KCl溶液中，20 000*g*，4℃离心15min。

(6) 去除所有上清液，沉淀用0.5～1ml双蒸水溶解后在微量匀浆器中研磨约5min以破碎沉淀。

(7) 匀浆液定容至4ml后分装至2个2ml的离心管中20 000*g*，4℃离心15min。

(8) 小心收取上清液（包含基质蛋白），于－80℃冻存。

(9) 沉淀部分包括线粒体内膜和未破碎的沉淀。将沉淀溶于4ml双蒸水中，液氮下反复冻融2次或3次。20 000*g*、4℃离心15min。收取沉淀即为内膜部分。也可以用100mmol/L Na_2CO_3清洗内膜部分以富集膜内在蛋白。

(10) 分离外膜以及膜间隙蛋白组分，以及从基质（MA）中去除污染的膜成分需要使用超速离心。将贮存在－80℃的基质以及外膜与膜间隙组分在4℃融解后100 000*g* 4℃离心1h。对于外膜与膜间隙组分，上清液即为膜间隙蛋白质，沉淀即为外膜部分；对于基质组分，上清液即为纯的基质蛋白质溶液。各部分可以重新冷冻保存。

(11) 样品纯度通过测定各组分的标志性酶活性即可判定。内膜：细胞色素氧化酶（COX）；基质：延胡索酸酶；膜间隙：肌激酶；外膜：抗生素A不敏感的NADH细胞色素C氧化还原酶。也可以用抗体识别各标志性酶的反应来确定各组分的纯度。各组分蛋白质在SDS-PAGE胶上显示出不同的条带分布特征（图7-3）。

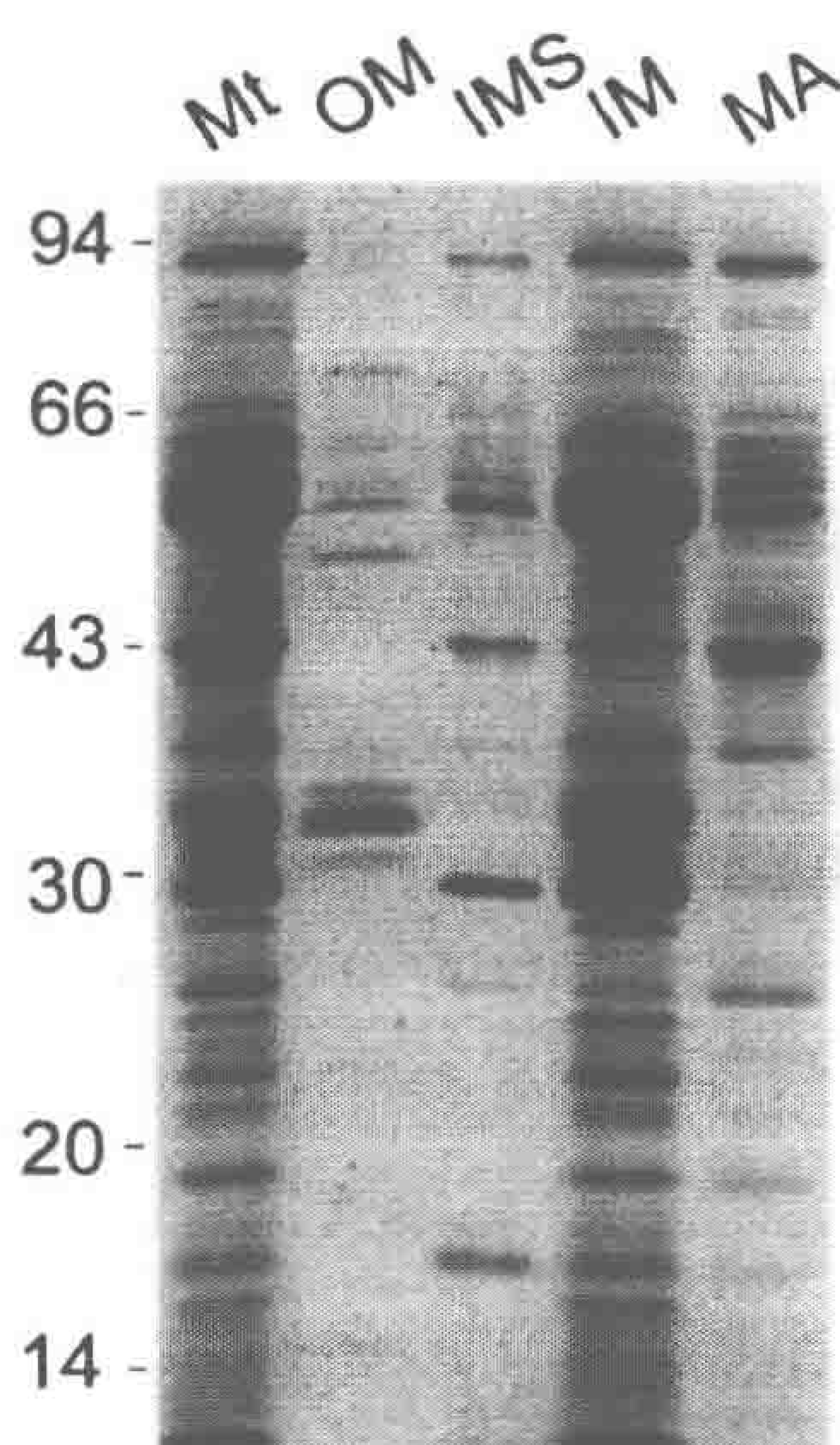


图7-3　SDS-PAGE分离线粒体4种成分的蛋白质条带分布图（考马斯亮蓝染色）

Mt. 线粒体；OM. 外膜；IMS. 膜间隙；IM. 内膜；MA. 基质。蛋白质在电泳前溶解在Laemmli缓冲液中

7.4 注　释

(1) 硅胶质 Percoll 利于等渗梯度的形成，通过等密度离心便于通过利用线粒体的密度特性来分离该细胞器。常用的方法是通过用固定转角的转头离心 Percoll 溶液来获得密度梯度。因为多分散的胶质（平均颗粒直径约 29nm，密度≥2.2g/ml）在大于 10 000g的离心力下会沉降而产生梯度。Percoll 的起始浓度以及形成梯度需要离心的时间应通过试验来具体确定。

(2) 根据所用植物组织材料的不同，Percoll 梯度常常需要做出相应的调整。表 7-1 列出了一些文献报道的从不同植物组织中提取线粒体所采用的密度梯度方法。图 7-1 展示如何制备这些梯度。

(3) 非连续 Percoll 梯度法分离线粒体可以让线粒体富集在不同浓度的界面处，因而常常被使用。制备非连续 Percoll 梯度溶液简单易行。将附带 19 号规格针头的注射器在木架上固定（图 7-1B）深入呈 45°角斜插在冰上的离心管底部内侧，然后缓慢依次注入梯度溶液（从下至上）即可。只有当来自不同组织的线粒体和其他细胞器的密度经过连续密度梯度离心确定之后，才能使用非连续梯度离心。GE Health 公司已有供应不同密度的标志小珠。

(4) 还原型的细胞色素 C 可以通过用 0.1mol/L Tris-HCl pH7.5 稀释氧化型的细胞色素 C，并加入等摩尔量的抗坏血酸来获得。这步反应可以通过测量 400～600nm 的吸光值来观测。甚至只需用肉眼即可观测到。氧化型的细胞色素 C 呈红棕色，而还原型则呈粉红色。剩余的抗坏血酸在反应结束后必须用脱盐柱子（如 G25 或 PD10）去除。所得的还原状态的细胞色素 C 可以在－20℃保存数周。

(5) 线粒体制备必须尽可能迅速地在不超过 4℃条件下完成，不同的离心步骤之间尽量不要有过多的停顿。匀浆和粗提物清洗间隔时间对于完整线粒体的产率具有重要影响。

(6) 有些研究者在制备过程中省略了第 5 步和第 6 步。这在很大程度上取决于低速离心到底能否成功地去掉来自于细胞碎片和细胞核等部分的污染。

(7) 线粒体本身的密度决定了制备该细胞器的方法和所能获得样品的纯度。当前分离比较成功的线粒体样品一般也都含有 2%～5%的非线粒体蛋白质污染。比较理想的期望是通过增加一些步骤，使得样品中最终只含有 0.2%～1%的非线粒体蛋白质污染，如利用细胞器表面所带电荷或亲和捕捉技术。但是这些都还不常用。

(8) 在分离外膜/膜间隙与沉淀时使用的低渗溶液中蔗糖的浓度取决于不同的材料。这种渗透势可以在 10～80mmol/L 变化以确定最适浓度，从而保证外膜最大程度的破裂，而内膜最小程度的破裂。

表 7-1 不同研究者分离纯化植物线粒体时采用的不同的密度梯度策略

物种	组织	纯化方法[a]	参考文献
拟南芥非			
绿组织	培养悬浮细胞	1，3	*8*
		1，2，3	*9*
大麦	幼苗	1，3	*10*
豆	幼苗	1，3	*11*，*12*
花椰菜	芽	1，2	*6*，*4*
玉米	胚	1，5 或 6	*13*
	幼苗	1，3	*14*
碗豆	种子	1，2，3	*15*
土豆	块茎	1，3	*12*
		1，2	*4*
		1，2	*16*
	茎杆	1，3	*17*，*11*
水稻	幼苗	1，2，4	*18*
黑麦	幼苗	1，3	*14*
大豆	根	1，4	*19*，*6*
	培养悬浮细胞	1	*19*，*20*
烟草	培养悬浮细胞	1	*20*
		1，4	*21*，*6*
小麦	幼苗	1，3	*14*
		1，3	*10*
拟南芥			
绿色组织	叶子	1，3	*22*，*7*
碗豆	叶子	1，4	*6*
		1，2	*23*
大豆	子叶	1，4	*19*，*6*
菠菜	叶子	1，4	*24*
		1，2 或 3	*25*
烟草	叶子	1，3	*26*

a 分离纯化方法：1. 差速离心；2. 连续 Percoll 密度梯度；3. 非连续 Percoll 密度梯度；4. 连续 Percoll 与 PVP 密度梯度相结合；5. 非连续蔗糖密度梯度；6. 连续蔗糖密度梯度。

参考文献

1. Neuburger, M. (1985) in *Higher-Plant Cell Respiration, vol. 18* (Douce, R. and Day, D. A., eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 7–24.
2. Douce, R. (1985) *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function and Biogenesis*, American Society of Plant Physiologists.
3. Millar, A. H., Liddell, A., and Leaver, C. J. (2001) Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods Cell Biol.* **65,** 53–74.

4. Neuburger, M., Journet, E. P., Bligny, R., Carde, J. P., and Douce, R. (1982) Purification of plant-mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* **217,** 312–323.
5. Leaver, C. J., Hack, E., and Forde, B. G. (1983) Protein synthesis by isolated plant mitochondria. *Methods Enzymol.* **97,** 476–484.
6. Day, D. A., Neuburger, M., and Douce, R. (1985) Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Austr. J. Plant Physiol.* **12,** 219–228.
7. Quail, P. (1979) Plant cell fractionation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30,** 425–484.
8. Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P. (2001) Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis*. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol.* **125,** 943–954.
9. Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giege, P., and Leaver, C. J. (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* **127,** 1711–1727.
10. Focke, M., Gieringer, E., Schwan, S., Jansch, L., Binder, S., and Braun, H. P. (2003) Fatty acid biosynthesis in mitochondria of grasses: malonyl-coenzyme A is generated by a mitochondrial-localized acetyl-coenzyme A carboxylase. *Plant Physiol.* **133,** 875–884.
11. Eubel, H., Jansch, L., and Braun, H. P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* **133,** 274–286.
12. Braun, H. P., Emmermann, M., Kruft, V., and Schmitz, U. K. (1992) Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Genet. Genom.* **231,** 217–225.
13. Logan, D. C., Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Hill, S. A., and Leaver, C. J. (2001) Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* **125,** 662–672.
14. Borovskii, G. B., Stupnikova, I. V., Antipina, A. I., Vladimirova, S. V., and Voinikov, V. K. (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biol.* **2,** 5.
15. Benamar, A., Tallon, C., and Macherel, D. (2003) Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Sci. Res.* **13,** 35–45.
16. Diolez, P. and Moreau, F. (1983) Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. *Physiol. Plant.* **59,** 177–182.
17. Eubel, H., Heinemeyer, J., and Braun, H. P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol.* **134,** 1450–1459.
18. Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Whelan, J., and Millar, A. H. (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* **132,** 230–242.
19. Tanudji, M., Djajanegara, I. N., Daley, D. O., et al. (1999) The multiple alternative oxidase proteins of soybean. *Austr. J. Plant Physiol.* **26,** 337–344.
20. Vanlerberghe, G. C. and Mcintosh, L. (1992) Lower growth temperature increases alternative pathway capacity and alternative oxidase protein in tobacco. *Plant Physiol.* **100,** 115–119.
21. Norman, C., Howell, K. A., Millar, A. H., Whelan, J. M., and Day, D. A. (2004) Salicylic acid is an uncoupler and inhibitor of mitochondrial electron transport. *Plant Physiol.* **134,** 492–501.

22. Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W., and Braun, H. P. (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127,** 1694–1710.
23. Douce, R., Bourguignon, J., Brouquisse, R., and Neuburger, M. (1987) Isolation of plant mitochondria—general principles and criteria of integrity. *Methods Enzymol.* **148,** 403–415.
24. Pastore, D., Stoppelli, M. C., Di Fonzo, N., and Passarella, S. (1999) The existence of the K+ channel in plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **274,** 26,683–26,690.
25. Glaser, E., Knorpp, C., Hugosson, M., and vonStedingk, E. (1995) Macromolecular movement into mitochondria. *Methods Cell Biol.* **50,** 269–281.
26. Michalecka, A. M., Agius, S. C., Moller, I. M., and Rasmusson, A. G. (2004) Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J.* **37,** 415–425.

第8章 根分生细胞核蛋白质提取

Fernando Gonzalez-Camacho 和 Francisco Javier Medina

摘要 核蛋白的分离和提取促进了植物蛋白质组学的研究。这项技术依赖亚细胞分离，用其可以鉴别出一个亚细胞器的蛋白质组，这项技术也被用于细胞核。核蛋白质分离方法是根据在不同离子强度的缓冲液中蛋白质溶解度不同而提出的。这套物理标准，配合着某些步骤中其他试剂的使用，如去垢剂或酶，产生出的分离成分在功能上也得到了验证。这套方法可以出产5份馏分，第1份馏分中含有和核膜及细胞骨架相关的蛋白质。第2份馏分可以溶于低离子强度浓度，含有活跃于核 RNA 代谢的核糖核蛋白。在增加离子强度和用脱氧核糖核酸酶酶解之后，会产生染色质馏分。最后，将得到有关核基质的第4份和第5份馏分，它们会分别以溶解在高盐浓度溶液中或者以沉淀的形式存在，这种沉淀只有在超声波条件下，7mol/L 尿素中溶解。这种方法有着宽泛的适应性，可以应用于基因组未测序的植物中。总之，利用本章中讲述的提取方法的功能性标准可得到有价值的、有用的信息。

关键词 分离核；蛋白质分馏法；核糖核蛋白；核基质

8.1 前　　言

用蛋白质组学鉴别植物蛋白质经常遇到植物基因组序列数据量不够的问题。只有拟南芥和水稻被全部测序，这就意味着只有极少情况下可以专门使用质谱分析法（MS）鉴别蛋白质，通常是用拟南芥这种模式植物[1,2]。在其他情况下，MS 测序可以同时用 Edman 测序[3,4]来测定氨基酸末端序列。另一种方法是在用光谱分析法测得末端序列后鉴别蛋白质，然后和已知序列的基因比对[1,3,5,6]。总的来说，用已知基因组序列的模式植物研究极大推进了植物蛋白质组学。

我们这里描述的这种方法适用于未知基因序列的植物。集中研究少数蛋白质，这些蛋白质存在于已知功能的不同馏分中。因此，我们研究亚细胞结构的蛋白质组学，即细胞核研究，并且将它分为亚蛋白质组进行研究。

很明显，第一步是获取生物材料以用来研究。因为我们感兴趣于研究核蛋白相关的细胞增殖，所以我们选择根尖分生组织细胞群。材料是匀浆后纯化细胞器（此处为细胞核）。从分生组织细胞中分离细胞核比较容易，因为这类细胞核占据很大体积。

从这些被纯化的细胞核中，通过逐渐增加缓冲液离子强度而逐渐增大蛋白溶解度，依次得到的蛋白质组分，最后得到一系列的亚蛋白质组[8]。首先得到漂洗组分包含核膜和残留细胞骨架的蛋白质。随后得到的馏分可溶解在含有 EDTA 的低离子强度缓冲液

中，此溶液被称为 S2，从这里我们得到溶解性最好的核蛋白质，即核糖核蛋白[9]。第三步，在用糖核酸酶反应后，我们会提取到染色质蛋白质。最后的两份馏分中含有细胞核基质蛋白质，先溶解在高盐缓冲液中，然后得到不溶的沉淀。这些不溶性沉淀和含有 RNA 的微丝网有关系[10]。

在提取一系列的蛋白质之后，每份馏分都在适合的缓冲液里溶解，以便于单向电泳或双向凝胶分离蛋白质。事实上，双向凝胶可以用于各种处理情况下的细胞蛋白质表达情况比较，如不同生理状态细胞，或某种的突变体或转基因植株，或药物处理，或受到不同刺激物刺激。特别是我们已经使用这种方法鉴定细胞增殖过程中的核蛋白质[11]，以及测定在国际空间站中由微重力而引起的表达变化[12]。

8.2 方　　法

8.2.1 植物材料和提取介质

（1）萌芽：为了让洋葱（*Allium cepa* L.）鳞茎出根，使用圆桶状玻璃器皿，里面装过滤水（milli-RO4 水；Millipore，Bedford MA）。

（2）提取介质：被收集的植物材料置于提取介质中。提取介质是为稳定亚细胞馏分的混合试剂。依照 Greimer 和 Deltour[13] 所述并稍作改动：2%阿拉伯树胶（Sigma）、1.25%Ficoll（Sigma）、2.5%硫酸葡萄聚糖（Fluka）、25mmol/L Tris-HCl（pH7.4）、0.5mmol/L EDTA、2.5mmol/L $MgCl_2$、4mmol/L 正辛醇、8mmol/L β-巯基乙醇（Sigma）、6.8mmol/L 二乙基焦磷酰胺（DEPC）（Sigma）、30%甘油及蛋白酶抑制剂[含有 1μg/ml 抑肽酶（aprotinin）、1μg/ml 胃蛋白酶抑制剂（pepstatin）、1μg/ml 亮抑酶肽（leupeptin）、0.1mmol/L PMSF]，所有药品都来自于 Sigma（见注释 1 和注释 2）。注意：媒介中的两种成分——DEPC 和 β-巯基乙醇是有毒的，需要在通风橱中进行准备，并需要戴化学防护手套。

8.2.2 细胞核的提纯

（1）样品匀浆：使用高速分散搅拌器（IKA、Labortechnik、Staufen、Germany），并通过 3 层尼龙布过滤，3 层尼龙布网眼直径分别为 100μm，50μm 和 30μm。

（2）保存提纯的细胞核：一旦细胞核被提纯出来，它们需要保存在细胞核贮存缓冲液中（NSB），它包含 10mmol/L Tris-HCl（pH7.4）、10mmol/L HEPES、10mmol/L KCl、2mmol/L $MgCl_2$、4mmol/L 正辛醇、0.1mmol/L $CaCl_2$、0.24mol/L 蔗糖、0.5mmol/L 亚精胺（Sigma）、0.15mmol/L 精胺（Sigma）、0.02%叠氮钠，并加入蛋白酶抑制剂混合物，见 7.2.1。

（3）这种缓冲液能够被贮存在 4℃条件下数月，需要防止真菌污染。蛋白酶抑制剂在使用之前方可加入，不要在准备溶剂的时候加入。

8.2.3 细胞核蛋白质的分离和提取

所有溶液都使用蛋白酶抑制剂。

(1) 含有膜和残留细胞骨架（图 8-1，泳道 M）：第一份馏分用 NSB 提取，NSB 含有 1%（*V/V*）Nonidet NP-40（Roche）和 0.5%（*V/V*）脱氧胆酸钠（Sigma）。

(2) 可溶性馏分（S2）（图 8-1，S2）：第二份馏分用低离子强度缓冲液提取，这种缓冲液含有 10mmol/L Tris-HCl（pH8.0）和 1mmol/L EDTA。

(3) 染色质馏分（图 8-1，Chr）：为了提取第三份馏分，使用的缓冲液由 NSB 组成，其中含有 100μg/ml 无 RNA 酶的 DNA 酶 Ⅰ（Sigma）和 0.5%Triton X-100。在 DNA 酶解之后，加入 0.25mol/L 硫酸铵。

(4) 高盐馏分（图 8-1，HS）：用含有 2mol/L NaCl 的 NSB 提取。

(5) 不溶性馏分或细胞核基质馏分（图 8-1，NM）：只能溶解于尿素缓冲液，其含有 20mmol/L MES（pH6.6）、1mmol/L EGTA、0.1mmol/L $MgCl_2$、1%β-巯基乙醇、0.02%叠氮钠、0.5%Triton X-100、8mol/L 尿素、2mol/L 硫脲。缓冲液可以在 4℃条件下稳定保存数月，但是尿素会遇冷结晶，所以在使用之前可以放置在室温下，或在使用时轻微加热，不要超过 37℃。

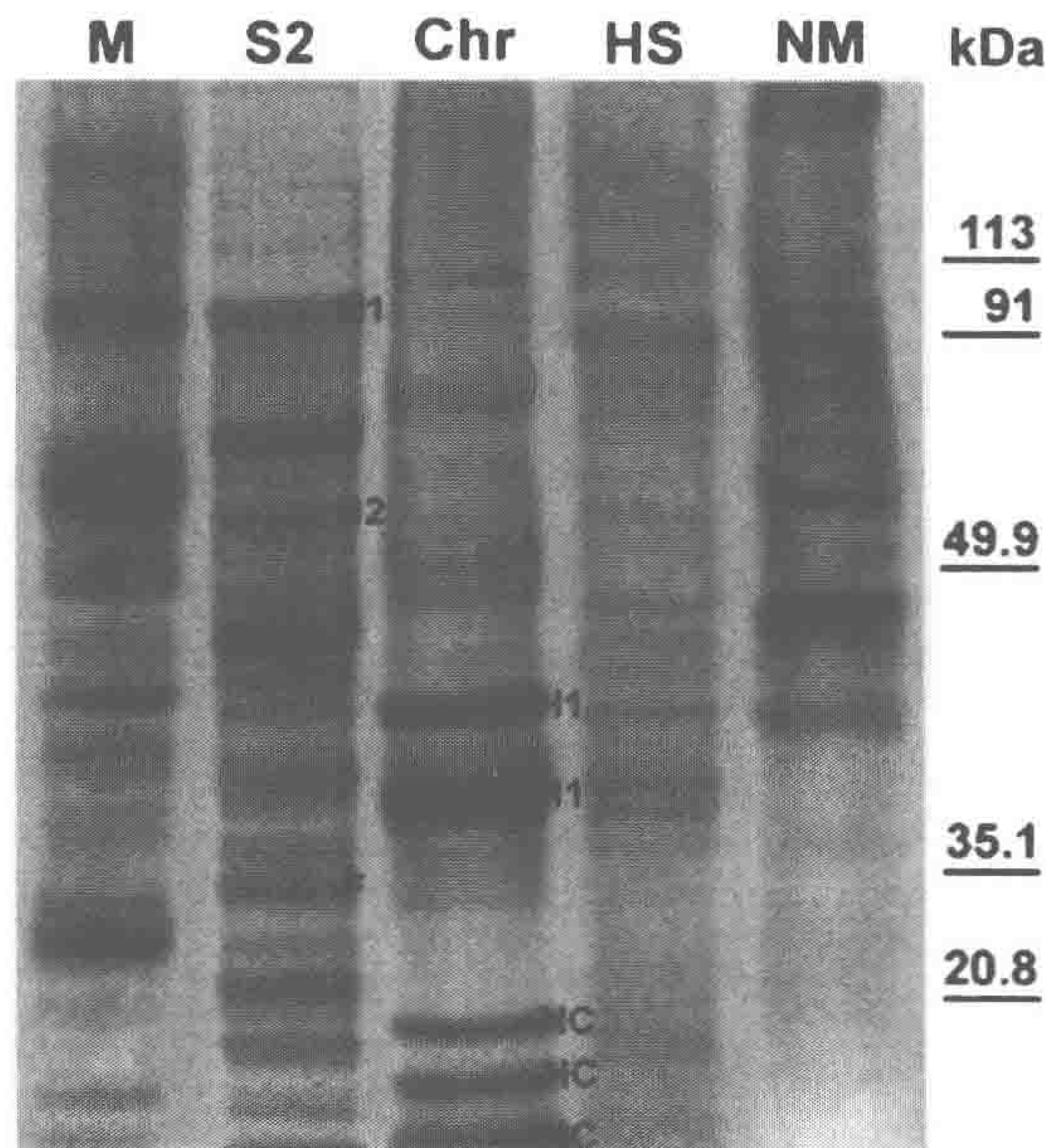


图 8-1　细胞核蛋白质馏分可以从洋葱根尖分生组织细胞中得到，用 SDS-PAGE 分离出来，并用考马斯亮蓝染色

每槽 10μg 蛋白质。由泳道 M 表示出的第一份馏分含有膜和残留的细胞骨架。泳道 S2 为可溶性核糖核蛋白馏分，由低离子强度的 EDTA 提取。泳道 Chr 为染色质馏分，在用 DNA 酶 Ⅰ 酶解之后释放。泳道 HS 为溶解于高离子强度（高盐）缓冲液的第一细胞核基质馏分。泳道 NM 为细胞核基质馏分中不溶的部分。kDa 是分子质量标记，为 1000Da。一些主要的条带被标出来，根据被描述的蛋白质，如核仁蛋白（nucleolin-like protein）NopA100（N1[11]）和 NopA64（N2[16]），核仁（F[14]），组氨酸 H1（H1）和核小体核心组氨酸（HC）

8.2.4 为 SDS-PAGE 和双向电泳准备蛋白质

(1) 沉淀步骤：用 7%TCA 沉淀每份馏分中的蛋白质。沉淀用乙醇/乙醚 3∶1 (*V*/*V*) 漂洗。

(2) 准备 SDS-PAGE：如果蛋白质需要用 SDS-PAGE 分离，蛋白质重悬于 Laemmli 缓冲液中。Laemmli 缓冲液由 10%甘油，0.2mol/L Tris-HCl，pH6.8，0.002%溴酚蓝 (Bio-Rad)，4%SDS，5%β-巯基乙醇。

(3) 准备双向电泳：干燥的细胞核蛋白质组分在重悬缓冲液中再次溶解。重悬缓冲液含有 40mmol/L Tris-HCl，2mol/L 硫脲，7mol/L 尿素，4%Triton X-100，100mmol/L DTT，2%载体两性电解质 (Bio-Rad) (pH4～7 载体两性电解质以 2∶1 的比率混合 pH3～10 两性电解质)，0.001%溴酚蓝 (Bio-Rad)。缓冲液可以不加入 DTT 和两性电解质，保存在室温下，这两样药品应该在蛋白质加载到凝胶之前加入缓冲液。

(4) 蛋白质浓度测定。使用考马斯亮蓝法 (Bio-Rad)。光密度可以用分光光度计在波长 595nm 测量出来。机器用含有 750μl 水，250μl Bradford 试剂和 1μl 电泳缓冲液 (Laemmli 或 Rehydration)，不含有蛋白质和溴酚蓝的溶液调整到零。获得的结果和标准曲线进行比对。标准曲线由已知浓度 BSA 的作出，变化范围从 1～140μg/ml。

8.3 方　　法

8.3.1 植物材料

(1) 洋葱 (*Allium cepa* L.) 鳞茎，除去棕色干枯的外皮，用自来水清洗，将每一个正立放在加有大约 90ml 过滤水的圆桶状玻璃容器中，这样只有底部浸没在水中 (见注释 3)。水必须以 10～20ml/min 的速率充气。每隔 24h 换一次水 (见注释 4)。

(2) 开始培养的 2～3 天之后，大部分的鳞茎会长出很多根；培养 3 天之后，可用于 95%的鳞茎每个茎上长出多于 40 条的根，每条至少 2cm。这些根可用于收集。

(3) 用解剖刀或刀片，去除掉根冠，然后用镊子夹取根尖前 3mm；这部分就是根的分生组织 (见注释 5 和注释 6)。取大约 500mg 的分生组织。

(4) 将样品放入有盖培养皿中，培养皿直径 4cm，装有 6ml 提取介质，蛋白酶抑制剂 PMSF 需要在使用前加入。

(5) 收集总量为 1g 的根分生组织。

(6) 培养皿必须被放置在冰块上。

(7) 注意：必须在通风橱中进行实验。

(8) 使用真空泵除去样品液的气体 10min，以促进介质渗透入样品。

8.3.2 细胞核的提纯

(1) 根的分生组织放在提取介质 (可以在 4℃条件下放置 15min 到一夜)，并分别用直径 100μm，50μm 和 30μm 的网眼过滤。

(2) 用抹刀收集留在尼龙布上的残留样品放入提取介质中，并将过滤的过程重复两

次。在匀浆过程中使用搅拌器旋转棒搅拌试管中样品，速度为 16 000r/min，搅拌 3 次，每次 5s，两次之间停顿 5s。

(3) 收集均一滤出液，并用在 800g，4℃离心 10min 的方法漂洗滤出物。

(4) 使沉淀在 1ml 的提取介质中再次溶解。枪头抽吸助溶，并离心 2 次以上。在这个过程结束后，沉淀含有较纯的细胞核。

(5) 将沉淀转移进含有 1ml NSB 的 1.5ml 离心管中。在光学显微镜下鉴定细胞核馏分，并检测它的丰度和纯度。可用相差显微镜检测，但是用简单的染色剂，如甲基绿/派洛宁，甲苯胺蓝，4，6-二脒-2-苯基吲哚（DAPI）能够帮助鉴别细胞核（见注释 8 和注释 9）。

8.3.3　用细胞核分馏法提取蛋白质

我们用 Penman 和其合作者[10]描述的方法设计这套实验，并做相应改动[14,15]。最重要的改动是引入了提取大部分可溶性蛋白质的步骤。据报道可以溶解在低离子强度缓冲液中的细胞核蛋白质有一定的功能，因为其中富含在细胞核 RNA 代谢中活性较高的核糖核蛋白[8,9,16,17]。

总的来说，此方法包含一系列用溶解度为标准的蛋白质分馏方法。样液依次增加严谨性和离子强度。提取方法步骤如下所述。

1. 膜和残留细胞骨架的馏分

(1) 第一步是被提纯的细胞核在 NSB 中反应，缓冲液中富含去垢剂。

(2) 在细胞核样液中加入 1%（V/V）NP-40 和 0.5%（V/V）脱氧胆酸钠，并在 4℃条件下在振荡器中振荡 10min。然后在涡旋振荡器中振荡试管 2 次，每次 20s。

(3) 在 1000g、4℃离心样液 10min，收集上清液，这即是第一份馏分（膜和残留的细胞骨架，图 8-1，泳道 M）。

2. 可溶性馏分（S2）

在涡旋振荡器上用 1ml 低离子强度的缓冲液将沉淀再次溶解。在振荡器中于 4℃条件下振荡 1h，然后 1000g、10min，4℃条件下离心，上清液为第二份馏分，被称为 S2 提取物，含有核糖核蛋白（图 8-1，S2）。

3. 染色质馏分

(1) 用 400μl 含有 100μg/ml 无 RNA 酶的 DNA 酶Ⅰ和 0.5% Triton X-100 NBS 将沉淀在涡旋振荡器中溶解。在室温下振荡 30min，这会酶解 DNA。

(2) 加入硫酸铵（400μl）以提取被酶解的 DNA，并在室温下反应 5min（见注释 10）。如先前的步骤一样，反应都是在旋转的定轨振荡器中完成。

(3) 在 2000g 离心 10min，取上清液，馏分中含有和染色质有关的蛋白质（图 8-1，Chr）。

4. 高盐馏分

(1) 将 400μl NSB 加到沉淀中，涡旋溶解，并加入 NaCl 提高缓冲液离子强度，最后缓冲液的浓度达到 2mol/L（见注释 11）。

(2) 在室温中将样品液在振荡器中振荡 5min，并在 10 000*g* 离心 10min。

(3) 上清液即第 4 份细胞核蛋白质馏分，含有第一份细胞核基质提取物，被称为高盐馏分（图 8-1，泳道 HS）。

5. 不溶性馏分或细胞核基质馏分

残留的沉淀含有细胞核基质的不溶性蛋白质。但是，为了使这些沉淀可溶，需要让其在 1ml 的尿素缓冲液反应，剧烈涡旋之后，在室温下用定轨振荡器振荡 45min。然后在两次涡旋振荡后，超声处理 30s（图 8-1，NM）。

8.3.4 为单向或双向电泳准备蛋白质

1. 蛋白质沉淀

(1) 在每份蛋白质的馏分中，即每步分馏过程中的上清液，需要用 7% TCA 在 0℃沉淀 2h。

(2) 在 10 000*g* 离心 30min，去掉上清液。

(3) 漂洗沉淀，去掉剩余的 TCA，用预冷的乙醇-乙醚在－20℃浸泡最少 2h，最长一夜。

2. 重悬于电泳缓冲液

(1) 在 20 000*g* 离心 30min 以收集蛋白质，并真空干燥沉淀。

(2) 在干燥的沉淀中加入 60μl Laemmli 缓冲液（如果做 SDS-PAGE）或者是重悬缓冲液，以用于双向电泳。

(3) 为了促进蛋白质在重悬缓冲液中的溶解，建议在冰上超声处理 3 次，每次 2s（见注释 12 和注释 13）。

3. 估测蛋白质浓度

(1) 用考马斯亮蓝反应测算蛋白质浓度[18]。将 1μl 的样液（不含溴酚蓝）加入 749μl 水和 250μl 考马斯亮蓝试剂。

(2) 涡旋振荡使其混合，并静置 15min 以用于染色。

(3) 用分光光度计测量光密度，并用标准曲线比较含量（见注释 14）。

细胞核蛋白质分馏过程和用 SDS-PAGE 进行一向电泳分离蛋白质的结果在图 8-1 中展示。

8.4 注　释

(1) 提取缓冲液可以在使用的前一天准备，但 PMSF 实验开始前加入。提取缓冲液密封并贴上标签，保存在冰箱里。

(2) 准备 PMSF 需加入 0.3484g 的 PMSF 到 20ml 异丙醇。溶液必须保存在冰箱里，因为它会在室温中快速降解。在保存的过程中，溶液会产生沉淀，轻摇再次溶解。

(3) 洋葱鳞茎干枯的棕色部分必须被完全移除，新生根的根冠必须小心清洗，以除去干枯根的残留部分。需要在水龙头下清洗鳞茎至少 30min。洋葱有季节性发芽的规律，最理想的生根季节是秋季和冬季。在超市或菜市场买到的商品洋葱都可，但需要考虑鳞茎可能受到物理或化学处理而阻止了根的生长。

(4) 连续注入空气可以使用一个简单的空气泵（如用在水族箱里的那种），并连接一套橡皮管，每根橡皮管都要通入容器水浸泡鳞茎的部分。

(5) 根冠的移除和分生组织的切取可以用封口膜固定的两片刀片，刀片间有 3～5mm 的空间。

(6) 来自于分生组织（增殖）细胞的数据和来自于非分生组织（不增殖）细胞的数据对比，可以在同一时间夹取不同根细胞的分生组织，丢掉紧挨着根分生组织 3mm 的片段，并收集剩余的根的部分。

(7) 除去提取介质气体的过程，应该在气泡开始从介质中冒出的压力下进行。在以后的细胞核提纯过程中，这步需要在冷的环境下完成（如在冰块上）。

(8) 当不同的样品进行比对时（如进行了不同的处理或在不同的条件下进行实验），细胞核的数量是根据比对进行了数据标准化而产生的结果。在光学显微镜下用记数板计算出细胞核的数量（Toluidine 蓝染色可提供帮助）。

(9) 若使用流动细胞计量器，提取媒介必须格外清澈。为了减少可能影响分析结果的沉淀，可以增加一次在 1 200*g* 条件下 30min 的离心。

(10) 应预先准备好 0.5mol/L 硫酸铵溶液。这种溶液非常稳定，甚至在室温条件下也可保存数年。要把少量的这种溶液加入样液中（4 次），以达到最后 0.25mol/L 的浓度。每次加入后需要剧烈地振荡试管。

(11) 需加入提前准备的 4mol/L NaCl 溶液以达到 2mol/L 这个浓度。4mol/L NaCl 溶液在室温中非常稳定。需要进行 8 次逐滴加入，共使用 400μl 的 NaCl。

(12) 蛋白质浓度可以根据取出其中一小份在不含有溴酚蓝的情况下测定出来。在任何情况下，如果一份样液在加入缓冲液后呈浅黄色，就意味着 TCA 没有被完全除净。为了克服这种情况，可以加入 2～3μl 在蒸馏水中饱和的 Tris-HCl。

(13) 除了用 TCA 溶解沉淀的蛋白质，硫酸铵和乙醇也可以被使用。而且，沉淀也可以被以 1∶1 的比例混合于样液中的缓冲液溶解掉。沉淀的作用在于尽可能地浓缩蛋白质，并测算它们的浓度。

(14) 在用于评测蛋白质浓度的标准曲线中，选择的区间（1～140μg/ml 的 BSA）可在光密度和蛋白质浓度之间产生线性关系。如果测量的结果超过了这个范围，则需要

在再测之前稀释蛋白质，并根据稀释的倍数算出最后的结果。

致谢

本书实验均在作者的实验室完成，并得到了 Spanish Plan Nacional de Investigacion Cientifica，Desarrollo e Innovacion Tecnologica，Grants 的支持。ESP2001-4522-PE 及 ESP2003-09475-C02-02。

参考文献

1. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., et al. (2002) Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol.* **129,** 823–837.
2. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P. C., et al. (2001) Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiol.* **126,** 835–848.
3. Prime, T. A., Sherrier, D. J., Mahon, P., Packman, L. C., and Dupree, P. (2000) A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **21,** 3488–3499.
4. Shen, S., Jing, Y., and Kuang, T. (2003) Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics* **3,** 527–535.
5. Mathesius, U., Keijzes, G., Natera, S. H. A., Weinman, J. J., Djordevic, M. A., and Rolfe, B. G. (2001) Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1,** 1424–1440.
6. Chivasa, S., Ndimba, B.K., Simon, W.J., et al. (2002) Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* **23,** 1754–1765.
7. Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., et al. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93,** 14,440–14,445.
8. Busch, H., Ballal, N. R., Rao, M. R. S., Choi, Y. C., and Rothblum, L. I. (1978) Factors affecting nucleolar rDNA readouts, in *The Cell Nucleus*, vol. 5, *Chromatin*, part B. (Busch, H., ed.), Academic Press, New York, pp. 416–468.
9. Bourbon, H. M., Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., and Amalric, F. (1983) Role of phosphorylation on the maturation pathways of 100 KD nucleolar protein. *FEBS Lett.* **155,** 218–222.
10. He, D., Nickerson, J. A., and Penman, S. (1990) Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* **110,** 569–580.
11. González-Camacho, F. and Medina, F. J. (2004) Identification of specific plant nucleolar phosphoproteins in a functional proteomic analysis. *Proteomics* **4,** 407–417.
12. Matía, I., González-Camacho, F., Marco, R., Kiss, J.Z., Gasset, G., and Medina, F.J. (2005) Nucleolar structure and proliferation activity of *Arabidopsis* root cells from seedlings germinated on the International Space Station. *Adv. Space Res.* **36,** 1244–1253.
13. Greimers, R. and Deltour, R. (1981) Organization of transcribed and nontranscribed chromatin in isolated nuclei of *Zea mays* root cells. *Eur. J. Cell Biol.* **23,** 303–311.
14. De Cárcer, G., Cerdido, A., and Medina, F. J. (1997) NopA64, a novel nucleolar phosphoprotein from proliferating onion cells, sharing immunological determinants with mammalian nucleolin. *Planta* **201**, 487–495.

15. De Cárcer, G., Lallena, M. J., and Correas, I. (1995) Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells. *Biochem. J.* **312,** 871–877.
16. Schnapp, A., Pfliderer, C., Rosenbauer, H., and Grummt, I. (1990) A growth-dependent transcription initiation factor (TIF-IA) interacting with RNA polymerase I regulates mouse ribosomal RNA synthesis. *EMBO J.* **9,** 2857–2863.
17. Dunham, V. L. and Bryant, J. A. (1983) Nuclei, in *Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells* (Hall, J. L. and Moore, L., eds.), Academic Press, London, pp. 237–275.
18. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem.* **7,** 248–254.

第9章 核蛋白提取

Setsuko Komatsu

摘要 亚细胞组分如细胞核的蛋白质组的完整性很大程度上由纯化过程中是否将其他细胞污染物从分离到的组分中除去决定。从植物中分离高纯度的细胞核是一个困难的任务。尽管如此，通过一系列的分离步骤，人们已经能够纯化细胞核。最初，人们利用2.0mol/L蔗糖密度梯度离心或Percoll密度梯度离心的方法从水稻悬浮细胞中分离细胞核。Morre和Anderson报道了的一种改进的蔗糖密度梯度离心方法。该方法被证明能从水稻悬浮细胞中更加快速有效地提取核。细胞核是平均直径约20μm的均匀球体。核蛋白使用裂解缓冲液或SDS样品缓冲液由纯化后的核中制备得到。核蛋白的纯度通过使用抗组蛋白H1抗体的Western杂交分析来评估。抗组蛋白H1抗体是一种核蛋白的特异抗体。我们在核组分中发现组蛋白H1，但上清液中没有。这说明制备产物富含核蛋白。

关键词 水稻；亚细胞组分；核蛋白；蔗糖密度梯度；组蛋白H1

9.1 前　言

真核细胞的核被含有磷脂的双层膜包裹。内层的核膜决定了细胞核自身的边界。在许多细胞中，外层核膜与糙面内质网相连。内外层核膜之间的空间与糙面内质网内腔相通。内外核膜在核孔处相连在一起。用冰冻蚀刻技术可以清楚地观察到这一现象。在分裂间期的核中，染色体呈25nm粗的细长丝状，并且无法通过光学显微镜观察到。不过，在光学显微镜下可以很容易地认出细胞核中的一种亚细胞器结构。核仁形成区是一个或多个染色体上与核仁相连的区域，它包含了许多指导核糖体RNA合成的DNA的拷贝。大多数的核糖体RNA是在核中合成的；当核糖体RNA通过核孔进入细胞质时，一些核糖体蛋白被在核仁中添加到核糖体RNA上。

细胞中不同的细胞器在大小和密度上均有差别。大多数分离手段的起始阶段使用差速区带离心或差速离心。此技术利用了超速离心产生的很强的沉积力。最初，人们利用2.0mol/L蔗糖密度梯度离心或Percoll密度梯度离心的方法从水稻悬浮细胞中分离细胞核。Morre和Anderson报道了一种改进的蔗糖密度梯度离心方法。该方法被证明能从水稻悬浮细胞中更加快速有效地提取核。细胞核是平均直径20μm的均匀球体。豌豆细胞核同样是平均直径20～30μm的均匀球体，但拟南芥的细胞核直径更小(5～10μm)且不是球形。在植物中，已有关于水稻和拟南芥细胞核蛋白质组成分的报道。在水稻中，利用双向电泳分辨出了等电点为4～10的549个核蛋白。此结果与Bae等报道的拟南芥

核蛋白的工作一致；他们检测到了等电点为3～10的544个蛋白质。

本章将介绍从植物组织中制备核蛋白的方法。

9.2 材　　料

（1）用于分离核蛋白的水稻悬浮细胞培养于含有1ml/L 2，4-二氯苯氧乙酸（2，4-D）的N6培养液中。培养条件为22℃持续振荡。

（2）匀浆液：50mmol/L HEPES（pH 7.4）、10mmol/L KCl、1mmol/L EDTA、10mmol/L抗坏血酸、0.1%牛血清白蛋白、20mmol/L二硫苏糖醇、400mmol/L蔗糖和1mmol/L PMSF。

（3）2.0mol/L蔗糖梯度：37.5mmol/L Tris-马来酸（pH 6.5）、5mmol/L $MgCl_2$和1%糊精（dextran）T500（Amersham Biosciences，Piscataway，NJ）。

（4）裂解缓冲液［用于双向聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）］：9.5mol/L尿素、2% NP-40、2%两性电解质（Ampholine）（pH 3.5～10.0）、5%巯基乙醇和0.05% PVP-40[3]。

（5）SDS样品缓冲液（用于SDS-PAGE）：0.06mol/L Tris-HCl（pH 6.8）、2% SDS、10%甘油和5%巯基乙醇[4]。

（6）磷酸缓冲液（PBS），pH 7.6：80mmol/L Na_2HPO_4、20mmol/L NaH_2PO_4、100mmol/L NaCl。

9.3 方　　法

（1）按照Morre和Anderson的方法从水稻悬浮细胞中分离细胞核，本文对方法进行了一些改动。所有分离细胞核的步骤都在冰上或4℃进行。

（2）3000*g*离心5min收集约3g水稻悬浮细胞并重悬于5ml冰浴预冷的PBS中。悬浮液再次用3000*g*离心5min。沉淀用5ml匀浆液重悬后转移至玻璃研钵中并研磨成匀浆。

（3）匀浆用双层Miracloth（Calbiochem、Darmstadt、Germany）过滤两次。

（4）转移匀浆至15ml falcon管中并用1000*g*离心10min。

（5）轻轻地用匀浆液重悬沉淀并置于2.0mol/L蔗糖梯度顶端，然后在4℃条件下50 000*g*离心30min。蔗糖梯度包含37.5mmol/L Tris-马来酸（pH 6.5）、5mmol/L $MgCl_2$和1%糊精T500。

（6）小心地除去上清液，沉淀再次轻轻地用5ml匀浆液重悬。

（7）再次将重悬液置于2.0mol/L蔗糖梯度顶端并用50 000*g*离心30min。将含有细胞核的沉淀重悬于100 μl匀浆液中并用光学显微镜观察。（图9-1A）。

（8）含有细胞核的悬浮液被用来提取核蛋白。可以用裂解缓冲液提取用于双向电泳的蛋白质样品，或用SDS样品缓冲液提取用于SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳的蛋白质样品。每20μl悬浮液中的细胞核可用500μl裂解缓冲液或SDS样品缓冲液在玻璃匀浆机中溶解。

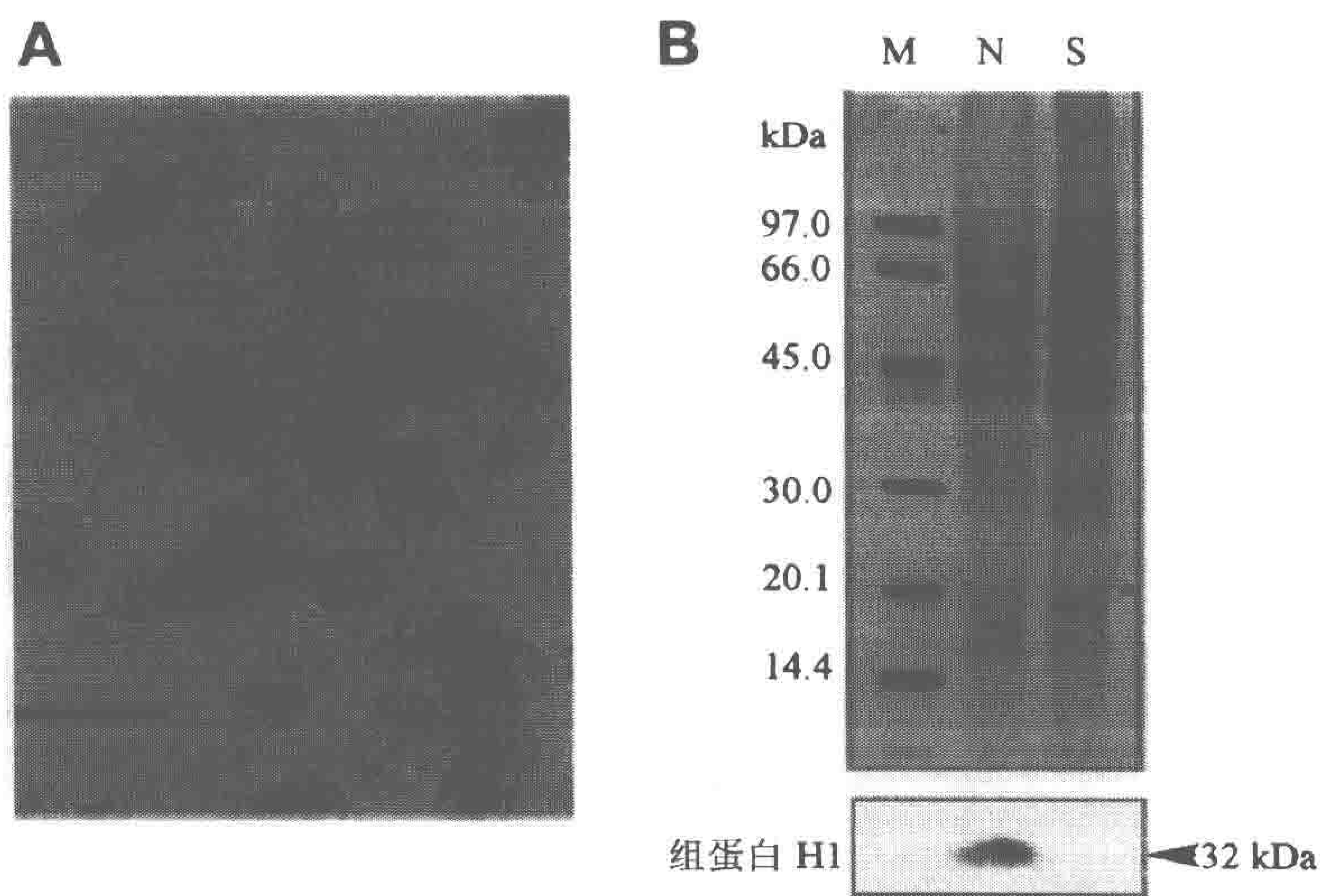
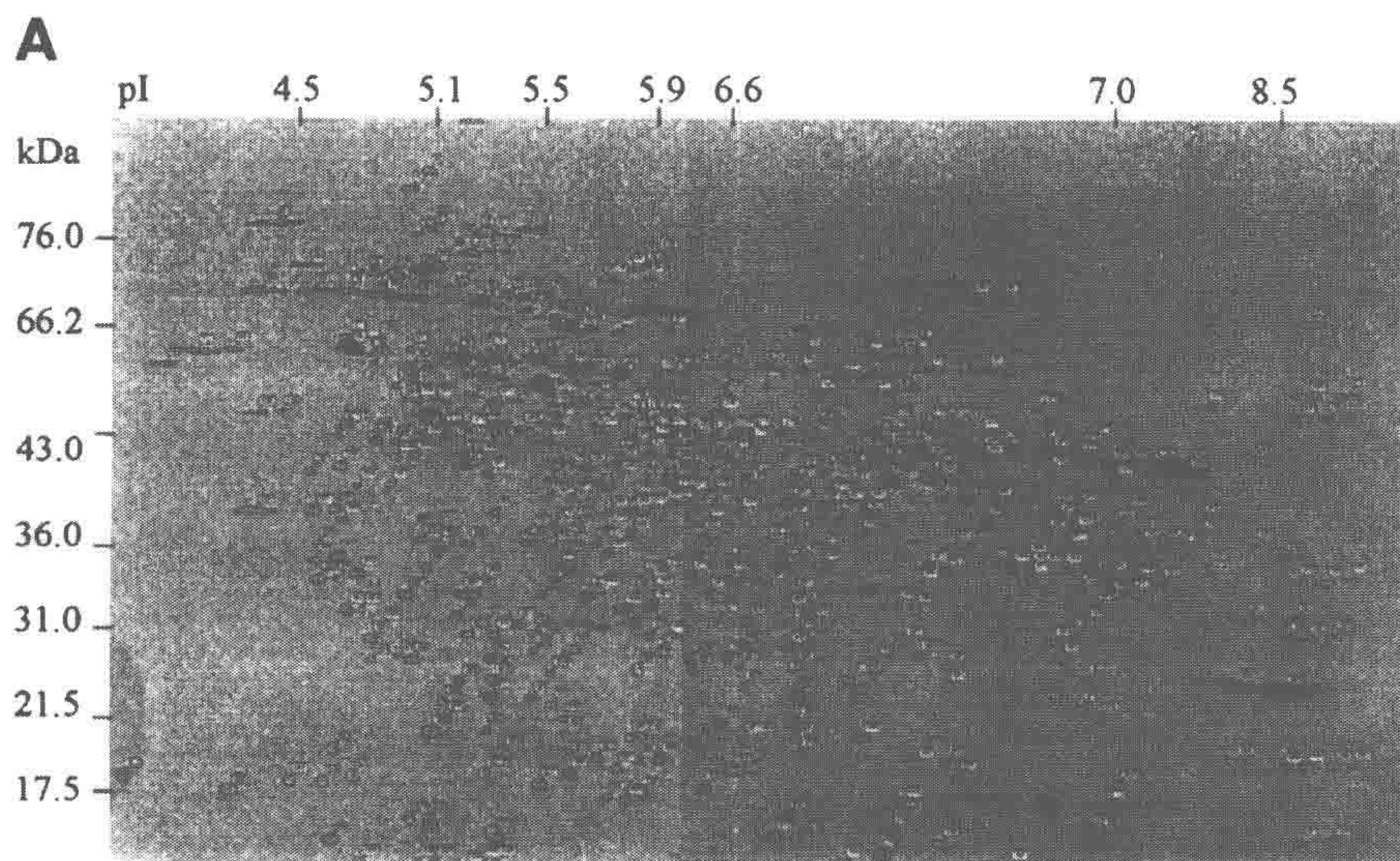


图 9-1　水稻细胞核蛋白提取

A. 分离得到的水稻细胞核的显微照片，标尺为 50μm；B. 用抗组蛋白 H1 的抗体对提取到的蛋白质进行 Western 杂交分析，蛋白质经 SDS-PAGE 分离并用考马斯亮兰（CBB）染色（上半部分）。经 SDS-PAGE 后，蛋白质被转移至 PVDF 膜上，并与抗组蛋白 H1 的抗体反应（下半部分）。M：低分子质量标准；N：由蔗糖梯度密度离心得到的细胞核部分；S：由蔗糖梯度密度离心得到的上清液部分[6]（改良自参考文献 [6]）

（9）核蛋白的纯度通过使用抗组蛋白 H1 抗体的 Western 杂交分析来检测（Santa Cruz Biotechnology，Santa Cruz，CA）（图 9-1B）。

（10）利用双向电泳分离用裂解缓冲液从纯化后的细胞核中提取的蛋白质（500μg）。（图 9-2，见注释 1）。



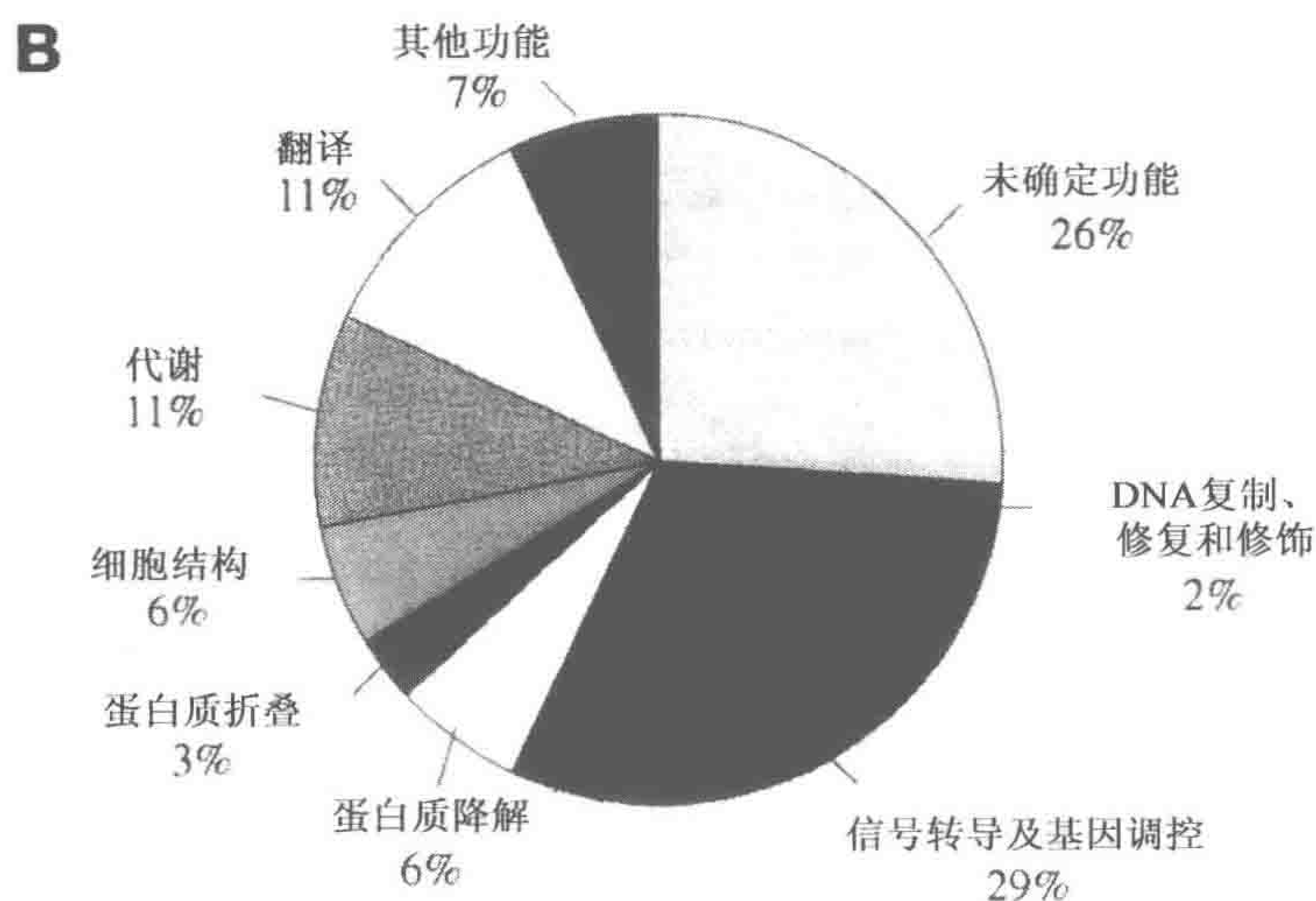


图 9-2 水稻细胞核蛋白的双向电泳图谱及被鉴定的细胞核蛋白的功能类别

A. 蛋白质提取自纯化的水稻悬浮细胞细胞核并由双向电泳分离。双向电泳第一向为等电聚焦（IEF）和固定 pH 梯度（IPG），第二向为 SDS-PAGE。由 IEF 和 IPG 胶条分别得到的双向电泳图谱在等电点 6.0 左右重叠。蛋白质点经考马斯亮兰（CBB）染色后由 ImageMaster 2D Elite 软件分析。图中数字显示不同细胞核蛋白点[6]。详细的核蛋白鉴定表在水稻蛋白质组数据库网站上，http://gene64.dna.affrc.go.jp/RPD/main.html。B. 图中显示各功能类别蛋白质占所有得到鉴定的蛋白质（190）的百分比[6]。为了了解细胞核蛋白的功能，得到鉴定的蛋白质被分成了不同类别。在 190 个经 Edman 测序和质谱分析得到鉴定的蛋白质中，最丰富的蛋白质类别是与信号转导和基因调控有关的蛋白质（29%）（改良自参考文献 [6]）

9.4 注　释

蛋白浓度由 Bradford 检测法测定。

参 考 文 献

1. Morre, D. J. and Andersson, B. (1994) Isolation of all major organelles and membranous cell components from a single homogenate of green leaves. *Methods Enzymol.* **228,** 412–419.
2. Folta, K. M. and Kaufman, L. S. (2000) Preparation of transcriptionally active nuclei from etiolated *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* **19,** 504–510.
3. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250,** 4007–4021.
4. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.
5. Darnell, J., Lodish, H., and Baltimore, D. (1990) in *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, New York.

6. Khan, M. and Komatsu, S. (2004) Rice proteomics: recent developments and analysis of nuclear proteins. *Phytochemistry* **65,** 1671–1681.
7. Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E.-Y., and Park, O. K. (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant J.* **36,** 652–663.
8. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15,** 473–497.
9. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.

第10章　紫花苜蓿茎细胞壁蛋白质提取

Bonnie S. Watson，lioyd W. Sumner

摘要　植物细胞壁是植物细胞具有高动态和化学活性的组分。细胞壁主要成分是多糖类，以及约占细胞壁体积10%的蛋白质。这些蛋白质很难以高纯度从碳水化合物复合体基质中分离。基质不仅固着了蛋白质而且是后续2-DE分析的污染物。成熟植物组织由于形成了包含酚类混合物的次级细胞壁给分离工作带来了更大的挑战。本章将讨论细胞壁中蛋白质的提取并且介绍一种从紫花苜蓿茎中分离细胞壁蛋白质的具体方法。包括研磨裂解细胞的方法，把细胞质蛋白和小分子污染物去除的多种洗涤方法包括水和有机溶剂的方法以及两种不同的盐抽提的方法。其中盐抽提的方法能够从紫花苜蓿茎的细胞壁中获得高浓度的细胞壁蛋白质片段。经过商业纯化试剂盒处理后，蛋白质提取物进行高质量和高分辨率的2-DE分离，从而能够通过质谱的方法较容易地得到鉴定。

关键词　细胞壁；蛋白质；蛋白质组学；提取；双向凝胶电泳；2-DE；SDS-PAGE；紫花苜蓿；$CaCl_2$；LiCl

10.1　前　　言

正如所有的亚细胞的蛋白质组学研究，提取细胞壁蛋白质组的关键因素是提取的蛋白质片段不能被来自细胞其他部位的蛋白质污染。通常情况下用两种方法来分离细胞壁的蛋白质。非破裂和破裂蛋白质提取两种方法各自有其优缺点，特别是有关蛋白质污染和改进当前的提取方法。第二个重要方面是多糖多酚类污染物的清除，它们在双向电泳中产生不良作用。过去，细胞培养为细胞壁蛋白质的提取提供了均一并且相对"干净"的组织来源。虽然分化的组织在生物学研究上相关性更强，但是研究起来更加复杂和困难，目前对于这些组织的大规模的蛋白质组的成果相对比较新。本章简单总结现有细胞壁蛋白质提取方法并且描述一种从紫花苜蓿茎中提取细胞壁蛋白质的具体方法。

提取细胞壁蛋白质最古老和温和的方法可能包括在适当的溶液悬浮或者洗涤直接从完整的培养细胞提取。史密斯等[1]把番茄的悬浮细胞用$CaCl_2$浓度梯度洗涤出伸展蛋白的前体流入小柱子。Scott和O' Neil[2]从胡萝卜悬浮细胞中通过用不同浓度的含有$CaCl_2$、TritonX-100和0.1mol/L LiCl的溶液提取胞外蛋白。在0.1%Triton X-100或0.1mol/L $CaCl_2$中萃取后的悬浮细胞可以再重新回到同样的培养液中生长。

从5种植物体中提取只含有初生细胞壁的蛋白质[3]是分离和鉴定大量细胞壁蛋白质的尝试之一。通过过滤收集细胞，通过在5种不同的缓冲液中搅拌细胞提取蛋白质。缓冲液包含0.2mol/L $CaCl_2$、50mmol/L CDTA、50mmol/L乙酸钠（pH6.5）、2mmol/L的

二硫苏糖醇、1mol/L NaCl 和 0.2mol/L 硼酸，pH 7.5，缓冲液用于后续和非后续的提取体系。Blee 等[4]采用了同时具有初生细胞壁和次生细胞壁的转化了的烟草的悬浮细胞系作为活细胞直接提取总蛋白的来源。蛋白质提取用 0.2mol/L $CaCl_2$、50mmol/L CDTA。

这个方法的改进后则是用真空透析的原生质体[5]或整个植物组织[6,7]来洗涤非原生质体和细胞壁的蛋白质。这个方法包括一个灌输步骤借助盐溶液或其他的溶液通过温和降低压力从而进入细胞间隙。Roger 等[5]用 1mol/L NaCl 和 0.4mol/L $CaCl_2$ 来透析来自于纤维植物下胚轴的固定原生质体，并通过离心和过滤收集非原生质体。马铃薯块茎中的非原生质体通过含有 0.6mol/L 的 NaCl 透析组织获得，然后，离心收集提取物[6])，已使用这种方法收集叶片中的汁液，这种方法采用含 20mmol/L 抗坏血酸、20mmol/L 氯化钙[7]的溶液。根汁液收集通过简单切割和离心组织收获分泌物[8]

非破坏性蛋白质提取方法的一个主要的缺点是，细胞壁蛋白质的产量通常较低。目前以基因组为基础的估算预测出数以百计的分泌蛋白[9]；然而只有这个数量的一小部分，在没有破坏的植物细胞壁的蛋白质研究中被发现。第二个缺点是质膜断裂的可能性将导致伴随细胞质和膜蛋白的细胞壁组分的污染。由于污染是一个巨大的障碍，因此确保细胞壁的纯度的方法应包括针对典型的污染蛋白质如检测标记酶的活性或 Western 杂交。

另一种从活细胞中洗脱细胞壁的蛋白质的方法是利用质膜的质壁分离使质膜萎缩脱离细胞壁。Borderies 等[10]用活拟南芥悬浮培养细胞来提取细胞壁松散结合的蛋白质。培养物首先用 50 %甘油质壁分离，然后相继用不同的缓冲液提取。利用两种不同的提取体系——NaCl、EDTA、0.2mol/L $CaCl_2$ 或 NaCl、EDTA、2mol/L LiCl 来优化方法并且减少提取处理所造成的膜渗透的问题。这些处理中的几个导致细胞壁蛋白污染上胞内蛋白，因此要利用透射电子显微镜来验证质膜的完整性。

破坏性蛋白质提取的方法是细胞壁蛋白提取的第二个主要途径，并且这个方法也应用了质壁分离。在用含有甘油和甘露醇的溶液处理拟南芥的悬浮细胞系后，将细胞通过一个 N_2 破碎弹（disruption bomb)[11])。随后细胞碎片被恢复并且通过显微镜检查。从准备的细胞壁材料中用 2%的十二烷基硫酸钠（ SDS ）提取蛋白质并用 Western 杂交分析污染的胞内蛋白。作为非破坏性的方法，污染是一个重大的问题，因此必须保证细胞壁的纯度。

在同一组发表的两篇文献中拟南芥悬浮细胞的匀浆液也被用来作为一个细胞壁蛋白质的来源[12,13]。在这两种情况下，细胞洗涤、过滤，并通过细胞破坏器。这些匀浆在甘油溶液中被分层并且通过重力沉淀后细胞壁组分被收集和洗涤。纯化的细胞壁由电子显微镜检查并且通过免疫荧光和免疫杂交检测污染的胞内或膜蛋白[12]。结果支持了作者的结论：细胞壁组分没有污染的蛋白质。在这两个文件中，细胞壁组分中的蛋白质先用 0.2mol/L 氯化钙提取然后用尿素缓冲液。

已经从挪威云杉木质部悬浮培养的活细胞中提取了细胞壁的蛋白质[14]。通过在 1mol/L 氯化钠的缓冲液中孵育的方法将细胞壁蛋白质从经过过滤和洗涤的细胞中洗脱下来。分离的细胞进行匀浆，随之蛋白质被释放，但在离子作用下又与细胞壁结合，用

1mol/L Nace 缓冲液进行提取洗脱以去除蛋白质得到完整的细胞壁。这些细胞壁经过分离、洗涤、匀浆并悬浮在提取缓冲液中。细胞壁经过冷冻干燥并且用混合纤维素酶/浸解酶处理来消化细胞壁，从而释放共价结合的细胞壁蛋白质。

传统上，从植物组织的细胞壁中提取的混合蛋白质用来分离单一蛋白质或某类特有蛋白质。举例来说，0.2mol/L 氯化钙被用来从大豆种子的种皮提取富含羟脯氨酸的细胞壁糖蛋白（HPRG）[15]。同样，从大豆幼苗中分离出了 HPRG[16]。细胞壁蛋白质用 10 %三氯乙酸（TCA）沉淀后，在余下的上清液中检测到了蛋白质。McQueen-Mason 等从黄瓜幼苗的盐溶性细胞壁蛋白质中纯化出了与延伸相关的细胞壁蛋白质[17]。McDougall[18]用一个单一的木质部，从云杉压缩和未压缩的木材枝条细胞壁中分离出了差异表达的氧化酶。

在分化的植物组织中不常大规模开展细胞壁蛋白质组学研究，主要是由于蛋白质、多糖、多酚类污染物造成的局限性，本章描述的这种方法可用于大规模进行细胞壁蛋白质组学研究和在实验中总结的解决蛋白质污染的途径和经验（见注释）。详见 http://cellwall.genomics.purdue.edu。该方法涉及细胞破碎，一系列的严格的清洗，以消除污染蛋白质，并且用氯化钙和氯化锂提取细胞壁蛋白质。为确保纯度实验步骤用 Bradford 实验和 SDS -聚丙烯酰胺凝胶电泳（ PAGE ）凝胶检测。用一个清除试剂盒处理后，纯化后的蛋白质就可以准备用于双向电泳分离。用这种方法从木质化紫花苜蓿（紫花苜蓿）茎细胞壁中分离得到了大量重复的各式各样蛋白质。这种方法减少了干扰一向和二向电泳的多糖和多酚物质，使得蛋白质准备样品中污染很少含有数只百计的蛋白质数量。蛋白质点可以很容易通过基质辅助激光解吸离子化-飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）或液相色谱（LC）/MS/MS 的方法得到鉴定[19]。

该方法的一个缺点是明显地缺少一些往往在其他类型的细胞壁材料中能够检测到的蛋白质。这些包括高度糖基化蛋白和质膜蛋白（PM）。这些糖基化蛋白比其他细胞壁蛋白更易溶因此可能会在去除胞浆蛋白时的严格清洗而丢失[19]。质膜蛋白并不像其他蛋白质那样紧密结合细胞壁因此在严格的清洗条件下也同样丢失。这些蛋白质可以通过双向电泳浓缩和分离，也可以用补充的非破坏性的技术来分离它们。像其他细胞壁蛋白质的提取方法一样，此方法的要求是确保细胞壁都是无污染的。洗涤后需要用 SDS-PAGE 或免疫杂交对标志性的酶进行检测以确定蛋白质提取物的纯度。

在此方法中选择的提取用盐溶液已被普遍用来洗脱细胞壁的蛋白质。通过离子交换，氯化钙与结合蛋白质进行交换使细胞壁蛋白释放出来[1]，它的交换能力比氯化钠更有效率[1]，与 0.1% Triton X-100 相比，氯化钙能够从活体培养的细胞壁中释放更多的蛋白质[2]，并且广泛应用于从植物细胞壁中提取细胞壁蛋白质[1-5,7,10,12,13,16,18,19]。众所周知膜的完整性会被 0.2mol/L 氯化钙破坏[10]；因此，我们选择了用 0.2mol/L $CaCl_2$ 从破碎的组织中提取细胞壁蛋白质。

本章介绍的方法还利用了氯化锂，一种常用的细胞壁蛋白萃取剂[10,20,21]。Voight[22]使用不等浓度的 LiCl（0.1～8mol/L）处理衣藻细胞并且发现从所有细胞周期阶段提取细胞壁蛋白质的最佳浓度是 2～4mol/L，超过 4mol/L LiCl 不会提取出更多的蛋白质。随着 LiCl 浓度的增加，更多的碳水化合物也伴随着蛋白质被提取出来。我

们的方法在提取中使用 3mol/L LiCl 来提取更多量的不含有额外共萃取碳水化合物的蛋白质。

虽然使用这种方法得到的分离洗前的细胞壁蛋白质用 SDS-PAGE 和免疫印迹检测似乎是干净的，但是只有约 50％鉴定蛋白质有一个信号肽。与其他细胞壁蛋白的蛋白质组学研究相比，经典分泌蛋白所占比例似乎是合理的[10,12]并且可能反映了从一个没有膜包围的细胞器中纯化其中蛋白质固有存在的困难。它也可能暗示了蛋白质分泌的非经典途径[23,24]。

10.2 材　　料

10.2.1　破碎组织、洗涤、凝胶或免疫印迹检测纯度

（1）液氮。

（2）研钵和研杵，冷却至 4℃。

（3）布氏漏斗，带把烧瓶，真空管。

（4）真空室或真空泵。

（5）尼龙网格膜（网孔，47μm^2），剪裁以适应布氏漏斗。

（6）刮板。

（7）1mol/L 乙酸钠，pH 5.5，贮存液。

（8）1mol/L NaCl，贮存液。

（9）1mol/L 抗坏血酸（避光保存），贮存液。

（10）匀浆缓冲液：50mmol/L 乙酸钠（pH 5.5）、50mmol/L NaCl、30mmol/L 抗坏血酸（见注释 1）Milli Q 水配制，4℃贮存。

（11）洗脱缓冲液 1：100mmol/L NaCl，Milli Q 水配制，4℃贮存。

（12）Milli Q 水，4℃贮存。

（13）丙酮－20℃贮存。

（14）洗脱缓冲液 2：10mmol/L 乙酸钠，（pH 5.5），Milli Q 水配制，4℃贮存。

（15）25％TCA。

（16）Bio-Rad 标准：10％～20％丙烯酰胺凝胶（cat. 编号 345-0042）或其他厂家的 SDS-PAGE 凝胶。

（17）考马斯亮蓝 R-250 染色液：1g/L，40％甲醇、5％乙酸，Milli Q 水配制，或其他合适的染色液。

（18）脱色：40％甲醇、5％乙酸，Milli Q 水配制，或其他合适的脱色液。

（19）Millipore Immobilon-P（cat 编号 1PVH20200）或其他 Western 杂交膜。

（20）免疫印迹的转膜缓冲液：25mmol/L Tris-HCl、192mmol/L 甘氨酸、20％甲醇或其他合适的转膜缓冲液。

（21）已知胞内蛋白质的抗体，如咖啡酰辅酶 A-邻甲基转移酶（CCoAOMT）。

（22）Amersham 的 ECL 试剂盒（cat 编号 RPN2109）或其他商业的 Western 杂交检测试剂盒。

10.2.2 从细胞壁蛋白质提取

(1) 1mol/L 氯化钙，贮存液。

(2) 5mol/L 氯化锂，贮存液。

(3) 1mol/L 乙酸钠，pH 5.5，贮存液。

(4) 提取缓冲液 1 ：200mmol/L 氯化钙、50mmol/L 乙酸钠（pH 5.5），Milli Q 水配制，4℃贮存。

(5) 提取缓冲液 2 ：3mol/L 氯化锂、50mmol/L 乙酸钠（ pH 5.5），Milli Q 水配制，4℃贮存。

10.2.3 蛋白质的浓缩和脱盐

(1) Amicon Ultra-15 离心过滤装置（ Millipore cat 编号 UFC900524）或其他浓缩装置。

(2) 蒸馏水或 Milli Q 水，4℃贮存。

10.2.4 浓度的测定、蛋白质清洗和样品的复水

(1) Bio-Rad 蛋白测定装置（cat 编号 500-0006 ）或其他蛋白浓度测定方法。

(2) 牛血清白蛋白（ BSA ）为标准。

(3) 蒸馏或 Milli Q 水。

(4) Bio-Rad ReadyPrep 2-D 清除试剂盒（cat. 编号 163-2130 ）。

(5) 悬浮缓冲液：8mol/L 尿素、4%CHAPS、20mmol/L 二硫苏糖醇（DTT)、0.2%的 Milli Q 水配制的两性电解液，SDS 样品缓冲液，或其他适当的缓冲液。

10.3 方　　法

10.3.1 组织破碎、清洗、凝胶检测纯度

(1) 收集 7～8g 成熟（节间 4～6）紫花苜蓿茎。这一重量的成熟茎组织这一数量中含有的细胞壁的蛋白质应多于 1mg（见注释 2)。收集后－80℃贮存或立即进入下一步。

(2) 所有的溶液置于冰上。

(3) 把茎剪成小块，1～2cm 的长度，使研磨更容易。

(4) 冻结的组织解冻（见注释 3)。

(5) 用研钵和研杵磨碎直至组织起泡沫（见注释 4 ）。确定组织研磨好了。先在没有缓冲液条件下磨碎，然后添加 10ml 的匀浆缓冲液再研磨一次。

(6) 将研磨好的组织放在铺于布氏漏斗和真空过滤器的尼龙网过滤纸上。用刮板在滤纸上均匀铺平组织。用 15ml 的匀浆缓冲液冲洗研钵和研杵，并用它来洗/过滤剩下的细胞碎片（见注释 5 ）。每次用 25ml 的缓冲液冲洗碎片颗粒 3 次以上，每 7～8g 初始组织总共用 100ml（约 14ml 缓冲液/g)（见注释 6 ）。采用真空泵去除洗液。保留洗液

部分以测定纯度（见注释 7）。纯度检测的适当方法为 SDS-PAGE 分析（图 10-1A，泳道 1 ）或以已知胞内蛋白质的抗体进行 Western 杂交（图 10-1B，条带 2 ）。

(7) 用 50ml 洗涤缓冲液 1（氯化钠洗液，见注释 8 ）清洗碎片。把它倒在放于尼龙过滤膜上的细胞碎片并且通过真空抽滤去除。当加入洗液时关闭真空泵并确保洗液接触了所有碎片。保留洗液部分，以测定纯度（图 10-1A，泳道 2；图 10-1A，泳道 3）。

(8) 用 50ml 蒸馏水重复清洗 2 次（图 10-1A，泳道 3；图 10-1B，泳道 4 ）。

(9) 用 50ml 冰冷丙酮冲洗 5 次（见注释 9；图 10-1A，泳道 4）。

(10) 重复步骤 9（图 10-1A，泳道 5）。

(11) 最后用 50ml 洗涤缓冲液 2 洗一遍（10mmol/L 乙酸钠；图 10-1A，泳道 6；图 10-1B，条带 5 ）。

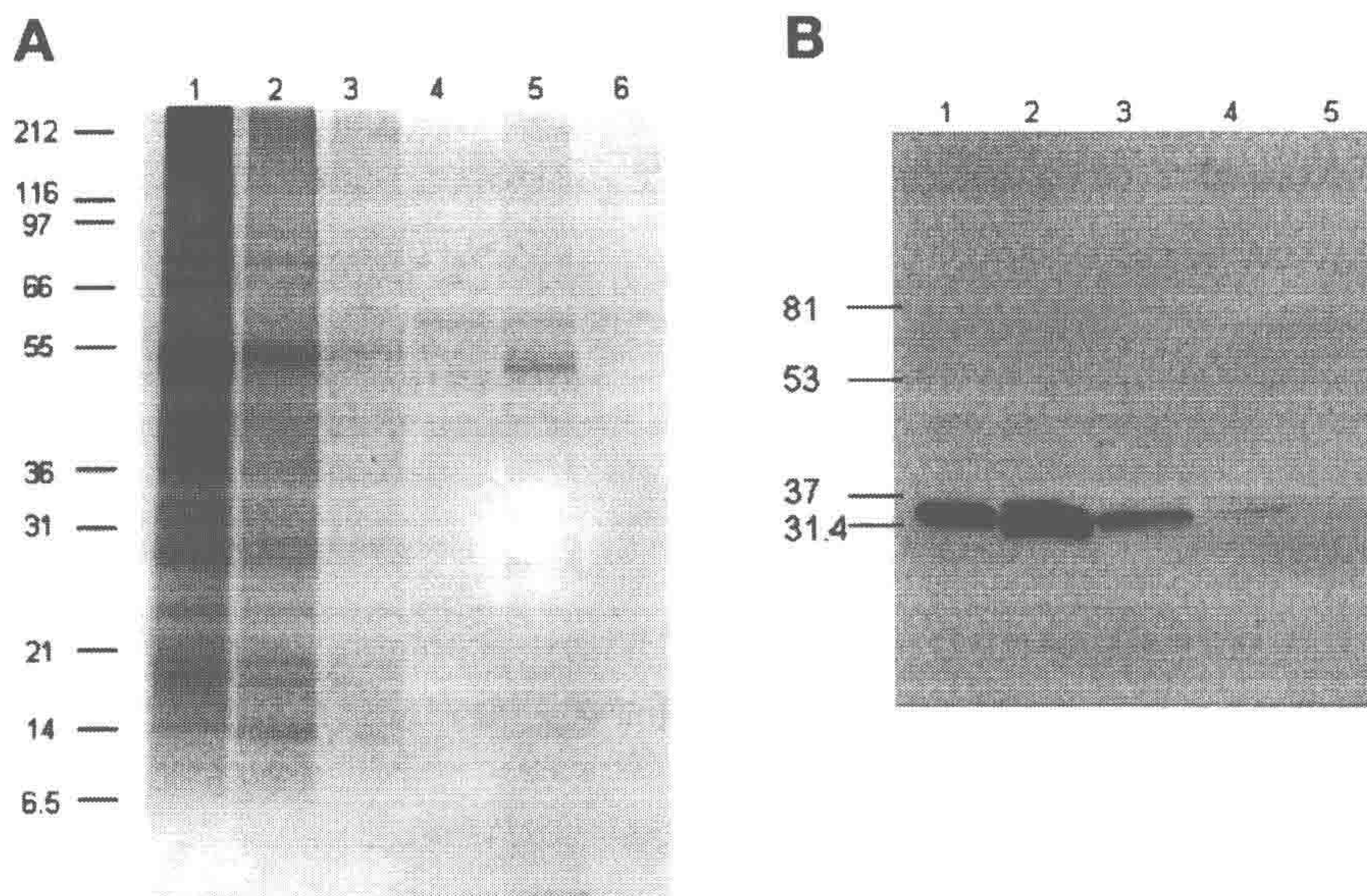


图 10-1　A. SDS-PAGE 和 B. CCoAOMT Western 杂交分析细胞壁准备的连续洗涤步骤

(A) 泳道 1，研磨缓冲液（可溶性部分），10.3.1.6 ；泳道 2，洗涤缓冲液 1（氯化钠洗涤），10.3.1.7；泳道 3，第一次水洗，10.3.1.8；泳道 4，丙酮洗涤，10.3.1.9；泳道 5，第二次水洗，10.3.1.10；泳道 6，洗涤缓冲液 2（乙酸钠洗涤），10.3.1.11。泳道 1 载有由 Bio-Rad 浓度检测试验所确定的 25μg 的蛋白质，泳道 2 载有 0.2 %的洗涤缓冲液，泳道 3 载有 0.4%的洗涤缓冲液，所有其他泳道包含的 1%各自用 TCA 沉淀的样品。蛋白质用 10%～20%的丙烯酰胺凝胶电泳和考马斯亮蓝染色。(B) 泳道 1，阳性对照，重组 CCoAOMT，一个已知的胞浆蛋白；泳道 2，研磨缓冲液（可溶性部分），10.3.1.6；泳道 3，洗涤缓冲液 1（氯化钠洗涤），10.3.1.7；泳道 4，第一次水洗，10.3.1.8；泳道 5，洗涤缓冲液 2（乙酸钠洗涤），10.3.1.11。泳道 1 载有 0.25μg 重组 CCoAOMT，泳道 2 包含了 0.2%（15μ g ）的可溶性部分；其他泳道包含 1%各自用 TCA 沉淀的样品。蛋白质被从10%～20%的丙烯酰胺凝胶转移到 PVDF 膜上，用 CCoAOMT 标记的抗体，1：10 000 稀释和 1：10 000 稀释辣根过氧化物酶标记的抗体。检测采用化学发光法（ Amersham ECL ）。(A) 改编自植物化学，65，Watson，B. S.，Lei，Z.，Dixon，R. A.，and Sumner，L. W.（2004）Proteomics of Medicago sativa cell walls. Phytochemistry 65，1709-1720，(由 Elsevier 公司许可)。

10.3.2　提取细胞壁的蛋白质

（1）把细胞碎片放入中在冰上的 50ml 管子里并且添加 7.5ml 提取缓冲液 1（氯化钙缓冲液）。倾向一边放置管子以增加细胞碎片接触提取缓冲液的表面积。固定在摇床上轻摇 30～45min。

（2）收集蛋白质提取液（见注释 10 ），水上再次加入适量的提取缓冲液重复提取 30～45min（见注释 11)。

（3）去除第二次的蛋白质提取液，将所得提取物与第一次的提取物合并。添加 15ml 提取缓冲液 2（氯化锂缓冲液）并且提取物在冰中放置至少 45min 或在低温盒里过夜（见注释 12 和注释 13 ）。

（4）在把提取物放入浓缩仪之前于 4℃离心机稍稍离心（约 1000*g*）以去除颗粒物。

10.3.3　蛋白质浓缩和脱盐

（1）根据仪器说明书的说明用离心浓缩仪浓缩样品（见注释 14)。我们偏向用 15ml 的 Amicon 超速离心过滤设备。提取物可以在此步骤分开或合并。浓缩到 100～150μl。

（2）来自 Bio-Rad 的 ReadyPrep 2-D 去除试剂盒，容纳盐的浓度高达 1mol/L，由于氯化锂提取物是在 3mol/L 的氯化锂中，通过向浓缩样本中加入 2 体积蒸馏水来脱盐，将样品再次浓缩。把蛋白质溶液转入一个 microfuge 管，把 200μl 的枪头减去枪尖可能有助于从浓缩仪中转移样品。用小体积（约 100μL）的蒸馏水或缓冲液冲洗浓缩仪的膜并与浓缩的蛋白质合并起来。

10.3.4　蛋白质清洗，样品的水化和浓度的测定

（1）确定蛋白浓度，使用 Bradford 法或相应的方法。

（2）在这个阶段的细胞壁制备物，不进行任何进一步清洗就可用于 SDS-PAGE（图 10-2，泳道 1 和泳道 2)，但蛋白条带不会像那些经过商业试剂盒处理并用 SDS 样品缓冲液溶解的那样清晰（图 10-2，泳道 3 和泳道 4)。

（3）对 2-DE（图 10-3A，氯化钙和氯化锂提取物相结合；图 10-3B，氯化钙提取物；图 10-3C，氯化锂提取物）来说，使用 Bio-Rad 的 ReadyPrep 清洗试剂盒（见注释 15 ）或其他商业化的试剂盒（见注释 16 ）处理。然后复水缓冲液中重新悬浮。Bio-Rad 试剂盒的作用量为 100μl 中的 1～500μg 的蛋白质。

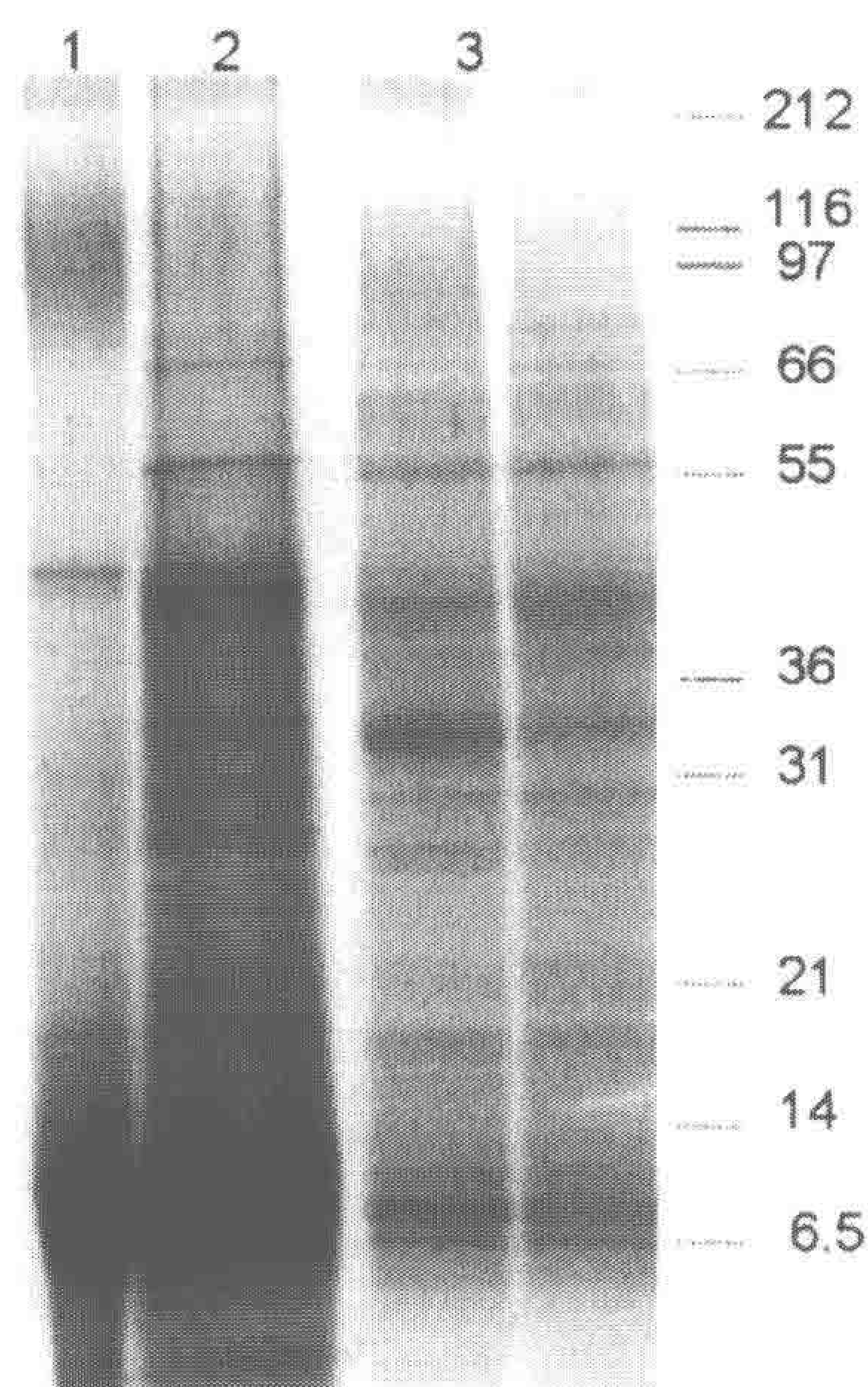


图 10-2　细胞壁蛋白的 SDS-PAGE 分析
泳道 1 和泳道 2 为处理前的蛋白质提取物（10.3.4.2)，泳道 3 和泳道 4 处理后的蛋白质提取物用 ReadyPrep 2-D 清除试剂盒（10.3.4.3 ）。泳道 1 和泳道 3 是氯化钙提取蛋白质（提取缓冲液 1 ），泳道 2 和泳道 4 是氯化锂提取的蛋白质（提取缓冲液 2 ）。每个泳道 25μg 蛋白质在 10%～20%的丙烯酰胺凝胶电泳后经过考马斯亮蓝染色的结果

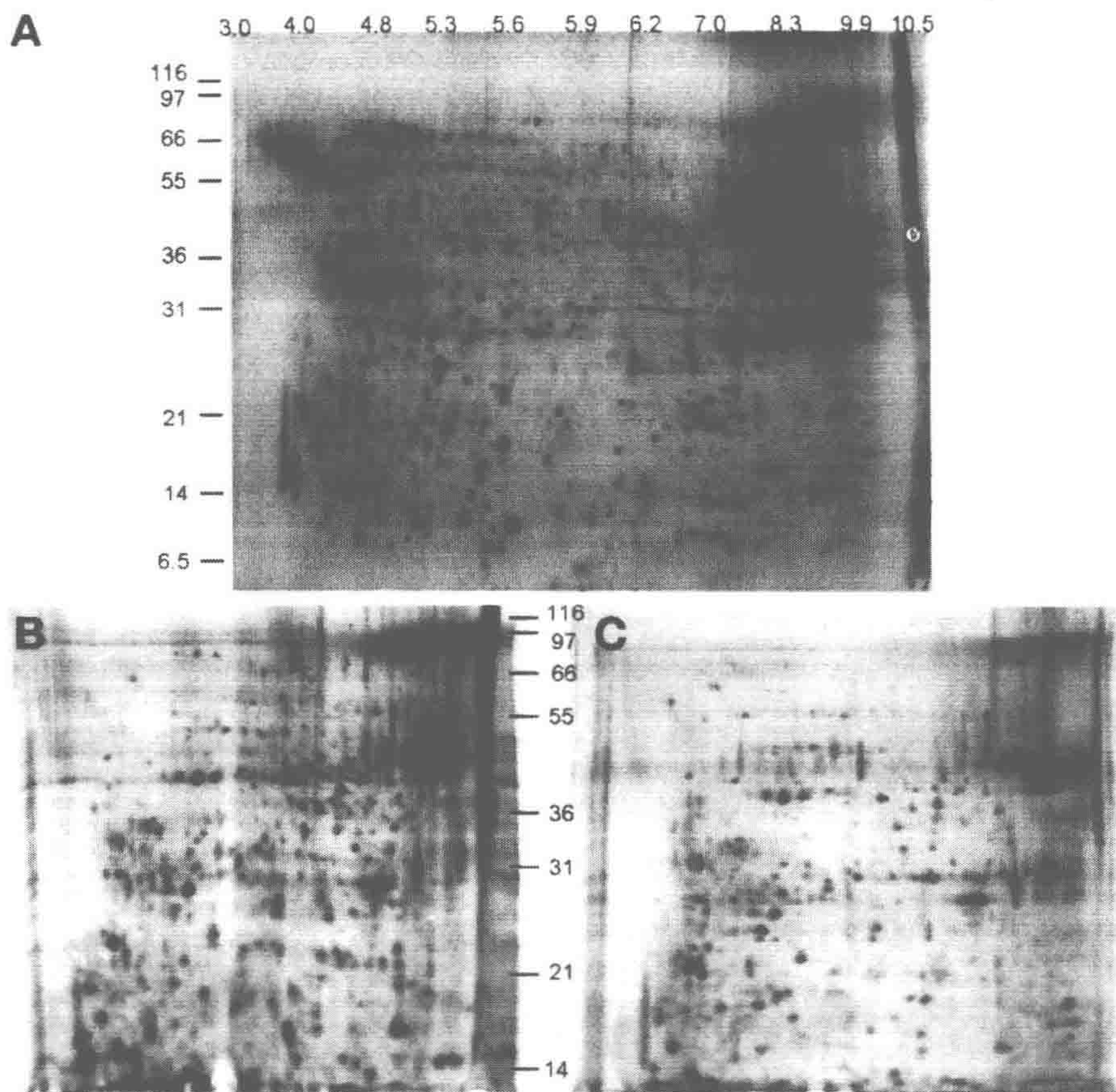


图 10-3　2-DE（A）$CaCl_2$ 和 LiCl 结合提取（提取缓冲液 1 和缓冲液 2）、（B）$CaCl_2$（提取缓冲液 1）提取及（C）LiCl（提取缓冲液 2）提取细胞壁的蛋白质。(A) 上样量为 500μg，采用 PI3～10，24cm 的胶条进行等电聚焦，最终达到 64 000Vh。分子质量标准列于凝胶的一边，PI 标记在最上方。上样量为 250μg 蛋白（B）和 150 μg 蛋白（C）采用 PI3～10，11cm 长的胶条进行等电聚集，最终达到 30 000Vh。分子质量标准与（A）中相同。等二向凝胶使用 12 %丙烯酰胺凝胶；所有凝胶都是银染

10.4　注　　释

(1) 酸性 pH 模拟了细胞壁的 pH 并且降低了蛋白酶的活性，氯化钠有助于防止细胞质的蛋白质与细胞壁结合，抗坏血酸有利于抑制多酚氧化酶的活性。

(2) 大约 3g 幼嫩茎（节间 1～3）可得到类似蛋白质产量。

(3) 冻融以后研磨的茎可能会显示出与那些新鲜研磨，或是那些在冻结状态研磨的茎相比稍有不同。选择最适合的方法，并统一研磨方法，研磨的一致性是非常重要的。

(4) 相对于玻璃匀浆器，用研钵和研杵进行研磨能取得更多重复性的结果。

(5) 与离心相比过滤有几个优势。过滤中使用的 $47\mu m^2$ 的尼龙网眼，使淀粉粒通过而保留了细胞壁，并且低速离心无法使碎片颗粒化。较高的高速离心能够形成坚实的颗粒，但它也使蛋白质从上清液中损失。

(6) 使用足够数量和足够次数的清洗，可以确保得到干净的细胞壁。建议的比率是每克鲜重用 6.7～7.0ml NaCl 乙酸钠，以 14ml/g 的比例水洗两次和 35ml/g 丙酮清洗 5 次。检测准备步骤（经 SDS-PAGE，Bradford，免疫印迹或选择其他方法），以确保该洗涤逐渐干净。

(7) $25\mu g$ 的可溶性蛋白质和每次用 1% TCA 洗涤所得沉淀足够用来通过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色来检测纯度。如果使用 Western 杂交来检测纯度，需要的蛋白质量更少或同等数量的蛋白质会带来更高的纯度保证。

(8) 这是简短温和的盐湖主过程，主要是消除膜相关蛋白和胞质蛋白。高盐的浓度或长期暴露则可提取细胞壁的蛋白质。提高盐浓度或延长湖主时间可提取细胞壁蛋白。

(9) 丙酮破坏细胞膜并清除膜蛋白、叶绿素和其他污染物质。

(10) 使用枪头向离心管的一个面压细胞碎片并从提取缓冲液挤出，也可以用过滤装置来从提取的蛋白质中分离碎片，不过，这可能造成蛋白质的损失。我们建议每克初始组织用至少 2ml 的提取缓冲液进行提取。

(11) 用氯化钙提取两次以防首次提取物被残余洗液稀释。

(12) 如果细胞壁在低温下过夜提取，蛋白质产量高，但较短的提取时间（45min）同样可以得到理想的蛋白质产量。

(13) 已经尝试其他几个提取程序，但只取得了较少的高质量数据。

a. 尿素提取后用氯化钙提取。虽然两种提取物在 SDS-PAGE 和 2-DE 胶上都有可见蛋白质，但是尿素中的提取物在单向电泳中很脏并且两种样品的双向电泳凝胶上都有横纹且不美观。

b. TCA/丙酮或苯酚/乙醇于用于沉淀样品。用 TCA/丙酮沉淀的样品由于细胞壁多糖或其他污染物，使得双向电泳第一向中难以聚焦，最终使得双向电泳凝胶横纹较多。苯酚/乙醇沉淀样本更容易聚焦并且凝胶不会有那么多横纹，但蛋白质损失较多。

c. 在有或无蛋白酶抑制剂存在的情况下，提取物也用纤维素和果胶酶来处理，以消除多糖和其他物质。这有助样品聚焦，但凝胶仍然不美观，并且用尿素提取的蛋白质在用纤维素或果胶酶处理后几乎完全损失。

d. 细胞壁的残留物在 SDS 中煮沸并用 SDS-PAGE 凝胶分离；这导致数个蛋白条带被横纹和斑点覆盖。

e. 此外，对蛋白质溶液高速离心以消除多糖的效果甚微。

(14) 在尝试了包括沉淀和 Amicon Centricons 在内的其他浓缩蛋白方法后（见注释）发现 Amicon Ultra-15s 最适合我们。

(15) 如果不使用双向电泳清洁试剂盒，双向电泳中的第一向往往很难或不可能聚焦，并且第二向凝胶会产生严重托尾并且不美观，除非蛋白上样量（通常也是有杂质的）非常低（小于 $50\mu g$）。同样，蛋白样品的上样量增加不会成比例增加可见蛋白数量，这也与严重拖尾和不美观有关。

（16）我们采用了 Bio-Road 试剂盒，并得到了理想的实验结构，仅有一次出了问题，主要原因是所用试剂盒存放的时间太长了。

参考文献

1. Smith, J. J., Muldoon, E. P., and Lamport, D. T. A. (1984) Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. *Phytochemistry* **23,** 1233–1239.
2. Scott, T. K., and O'Neill, R. A. (1984) Cell wall proteins extracted from suspension-cultured cells, in *Structure, Function and Biosynthesis of Plant Cell Walls: proceedings of the Seventh Annual Symposium in Botany, January 12–14, 1984, University of California, Riverside* (Dugger, W. M. and Bartnicki-Garcia, S., eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 269–283.
3. Robertson, D., Mitchell, G. P., Gilroy, J. S., et al. (1997) Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. *J. Biol. Chem.* **272,** 15,841–15,848.
4. Blee, K. A., Wheatley, E. R., Bonham, V. A., et al. (2001) Proteomic analysis reveals a novel set of cell wall proteins in a transformed tobacco cell culture that synthesises secondary walls as determined by biochemical and morphological parameters. *Planta* **212,** 404–415.
5. Roger, D., David, A., and David, H. (1996) Immobilization of flax protoplasts in agarose and alginate beads. *Plant Physiol.* **112,** 1191–1199.
6. Olivieri, F., Godoy, A. V., Escande, A., et al. (1998) Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. *Physiol. Plant.* **104,** 232–238.
7. Hiilovaara-Teijo, M., Hannukkala, A., Griffith, M., et al. (1999) Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol.* **121,** 665–673.
8. Yu, Q., Tang, C., Chen, Z., et al. (1999) Extraction of apoplastic sap from plant roots by centrifugation. *New Phytol.* **143,** 299–304.
9. Lee, S. J., Saravanan, R. S., Damasceno, C. M. B., et al. (2004) Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol. Biochem.* **42,** 979–988.
10. Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., et al. (2003) Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: a critical analysis. *Electrophoresis* **24,** 3421–3432.
11. Bayer, E., Thomas, C. L., and Maule, A. J. (2004) Plasmodesmata in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma*, **223,** 93–102.
12. Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., et al. (2002) Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* **23,** 1754–1765.
13. Ndimba, B. K., Chivasa, S., Hamilton, J. M., et al. (2003) Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics* **3,** 1047–1059.
14. Kärkönen, A., Koutaniemi, S., Mustonen, M., et al. (2002) Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiol. Plant.* **114,** 343–353.
15. Cassab, G. I., Nieto-Sotelo, J., Cooper, J. B., et al. (1985) A developmentally regulated hydroxyproline-rich glycoprotein from the cell walls of soybean seed coats. *Plant Physiol.* **77,** 532–535.

16. Kleis-San Francisco, S. M., and Tierney, M. L. (1990) Isolation and characterization of a proline-rich cell wall protein from soybean seedlings. *Plant Physiol.* **94,** 1897–1902.
17. McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., and Cosgrove, D. J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* **4,** 1425–1433.
18. McDougall, G. J. (2000) A comparison of proteins from the developing xylem of compression and non-compression wood of branches of Sitka spruce *(Picea sitchensis)* reveals a differentially expressed laccase. *J. Exp. Bot.* **51,** 1395–1401.
19. Watson, B. S., Lei, Z., Dixon, R. A., et al. (2004) Proteomics of *Medicago sativa* cell walls, *Phytochemistry* **65,** 1709–1720.
20. Melan, M. A. and Cosgrove, D. J. (1988) Evidence against the involvement of ionically bound cell wall proteins in pea epicotyl growth. *Plant Physiol.* **86,** 469–474.
21. Voigt, J. and Frank, R. (2003) 14-3-3 Proteins are constituents of the insoluble glycoprotein framework of the *Chlamydomonas* cell wall. *Plant Cell* **15,** 1399–1413.
22. Voight, J. (1985) Extraction by lithium chloride of hydroxyproline-rich glycoproteins from intact cells of *Chlamydomonas reinhardii. Planta* **164,** 379–389.
23. Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., et al. (2004) Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Design* **17,** 349–356.
24. Pitarch, A, Sanchez, M., Nombela, C., et al. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 967–982.

第11章　植物质膜蛋白的提取和溶解

Véronique Santoni

摘要　在所有活细胞中质膜（PM）作为细胞质和环境之间的界面而存在，并且是最复杂的和分化程度最高的膜之一。由于其中许多蛋白质参与了细胞的基本职能如细胞信号传递、渗透调节、营养和代谢，因此膜蛋白的鉴定和功能分析（无论是外在或内在的）是一个至关重要的挑战。分离PM的方法依据有机体、组织、细胞类型的不同而改变。本章主要是通过两相分离系统从拟南芥微粒体膜中分离PM，主要运用不同膜具有不同的表面特性，质膜蛋白不能跨越脂质双层，并且经过双向电泳能很好复原。相比之下，跨膜蛋白质的复性首先需要从可溶性蛋白中除去质膜部分，要么是细胞内的污染物，或功能相关的蛋白质，其次是具体溶解方案的使用。本章介绍分离质膜的方案是基于膜的碱处理来溶解疏水性蛋白只增加它们在双向电泳凝胶中的复原性。高度疏水的水通道蛋白用于检测方案中相关物质。

关键词　水通道蛋白；拟南芥；疏水蛋白；质膜；蛋白质溶解；双向凝胶电泳；两相分离

11.1　前　　言

植物质膜（PM）调控着细胞与环境之间的信息和物质交流。这种界面的位置赋予PM蛋白在细胞活动中的关键作用，如信号转导、代谢、离子运输和内吞，以及对病原体的反应和细胞壁融合，这些都是具体的植物职能。细胞膜物理化学性质的不同是它们分离的基础。质膜可以根据三大程序纯化。

（1）PM与其他膜之间大小和密度的不同是用于分离的一个特点。该步骤需要对微粒部分进行连续或非连续的密度梯度离心[1]。

（2）自由流电泳程序利用细胞膜的电荷来分离细胞膜[2]。PM比其他膜带更多的负电荷并且因此可以有效地跟其他细胞膜分离。但这种做法需要一个特殊的自由流电泳仪装置。

（3）用两相分离法分离PM部分依赖于膜囊泡之间不同起源的表面特性[3]。这一技术潜在的原则是众多的水溶高分子质量的聚合物超过一定浓度不相互混合，而是形成分离相，每个分离相包含85%以上的水。这种含聚合物的分离相很适合做生物分析材料。根据不同的表面特性加入的膜在水性聚合物相之间被分离这项技术最初由Laesson等[3]描述，现在由于它实现了PM蛋白的高产和没有其他内膜污染，已被广泛使用在对植物群落的科学研究，此外，它是一个简单的方案，不需要特定的设备。

膜蛋白可分为两组：那些跨越脂质双层的蛋白被定义为内在或整合蛋白质，其他的为膜联蛋白。联合过程是由翻译后的修饰，如通过嫁接一个不饱和脂肪酸或蛋白质互作锚定糖脂来介导的。这暗示了蛋白质与 PM 关联的动力学的发生。在富含质膜的部分，无论是外在的功能与 PM 相关的蛋白质或胞质内的污染物[4]，很大比例（60%～80%）的蛋白质是可溶的。因此，由于整合蛋白质在 PM 部分的比例低，当直接溶解 PM 部分时，即使用如十二烷基硫酸钠（SDS）这种最高效率的去垢剂，可能在复性整合蛋白质方面效率也是低的。

以使用去污剂[5]、有机溶剂[5～7]或碱性处理膜[5,8,9]为基础的方法被用来分离镶嵌蛋白。其中，作为一种容易的且有效率的方法，碱性提取已得到了广泛普及，在不影响组分完整的情况下，有选择性地从膜上分离外在的蛋白质[10]。在本章中，描述了一个基于用碱性-尿素处理 PM 的方案，此方案能够复性疏水性非常强的蛋白质，如水通道蛋白[11-13]。

越来越多的数据显示，膜蛋白的功能和亚细胞定位是受翻译后修饰调控的。双向凝胶电泳构建了一个通用的能够分离修饰后蛋白质的方法。因此，由于等电点 pI 或是表观分子质量的不同，糖基化、酰基化或脱酰基化后的蛋白质点会成列出现[14,15]；磷酸化[16]和 *N*[17] *α*-乙酰化[17]分别把蛋白质的 pI 转向酸性 pH 和碱性 pH，但不改变表观分子质量。更为普遍的是，任何带电残基的共价修饰，都会修改蛋白质的净电荷，反过来使蛋白的 pI 发生变化。由于它们的高疏水性，造成了双向凝胶电泳分析整合蛋白质的局限性，需要使用特殊的溶解步骤[18]（见第 12 章），并且表达丰度低。本章描述了从模式植物拟南芥的根和叶悬浮细胞中纯化 PM 的方案，得到能用于蛋白质组学分析的可溶性 PM 蛋白。水通道蛋白是含有 6 个跨膜 α 螺旋[19～22]，26～35kDa 的疏水性质膜镶嵌蛋白（PIP），被用来作为评估相关的提取及溶解方案的对照蛋白质。

11.2　材　　料

11.2.1　生物材料

（1）拟南芥属（Heynh.）植物（生态型为 Wassilewskija 或 Columbia），培养条件如 Santoni 等[13]所述：营养液栽培。

（2）拟南芥属（Heynh.），生态型为哥伦比亚，24℃，连续光照的悬浮培养细胞，参照 Gerbeau 等[23]。

11.2.2　设备

（1）超纯水（双蒸，去离子），用于所有试剂的配制。

（2）作为合适用途（细胞培养，超纯电泳），试剂级别应该是最高级别的。

（3）华林式搅拌器：机械破坏植物材料（叶片和根）来生成悬浮细胞（见 11.3.1 节 1）。

（4）细胞破碎器：破坏拟南芥悬浮细胞（见 11.3.1 节 1）。Constant System，Warwick，UK）。

（5）固定化 pH 梯度（IPG；线性和非线性 pH 梯度 3～10，长 18cm；Amersham Pharmacia Biotech）。

（6）IPGphor 设备：分离电泳聚焦蛋白质（Amersham Pharmacia Biotech）。

（7）Protean II：用于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）（Bio-Rad）。

11.2.3 试剂

1. 产品和液体贮存液

（1）葡聚糖 T-500 和聚乙二醇（ PEG ）3350 分别购自 Amersham 和 Union Carbide。根据分子质量分别配制 20%和 40%的葡聚糖 T- 500 和 PEG3350 的贮存液（见注释 1）。

（2）0.2mol/L 的二水 EDTA 钠盐（的 EDTA-Na_2）贮存液的配置：500ml 的水（终体积）溶解 37.2g 的 EDTA-Na_2。在粉末中用 Trizma® 碱（Sigma）调整 pH 为 8。贮存在室温下数月。

（3）0.2mol/L EGTA 贮存液的配置：在 500ml 的水（终体积）中溶解 38.1g EGTA。用 Trizma® 碱调整 pH 为 8。贮存在室温下数月。

（4）leupeptin（Sigma，编号为 L2884）配制成 10mmol/L 贮存液（5mg，1.05mol/L 水），存放于－20℃半年。

（5）0.5mol/L NaF 贮存液：在 500ml 的水中溶解 10.5g 氟化钠。贮存在室温，最多保存一个月。

（6）0.2mol/L pH 7.8 的磷酸盐缓冲液贮存液：在 50ml 的水中溶解 1.4g KH_2PO_4。在 500ml 的水中溶解 17.4g K_2HPO_4。混合两种贮存液，配制成 550ml 的 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7.8。贮存在－20℃，可放置数月。

2. 缓冲液

（1）悬浮细胞的洗涤缓冲液（ WBSC ）：20mmol/L 氯化钾，5mmol/L EDTA。这个缓冲液是从 10 倍贮存液制成的 200mmol/L KCl（在 1L 中溶解 14.9g）与 50mmol/L 的 EDTA（在 1L 中溶解 18.6g）混合在一起。－20℃贮存数月。

（2）均匀的介质：匀质化介质的最低要求，是存在一个渗透势从而减少细胞器的肿胀和破裂，缓冲液的 pH 7～8，从而减少水解酶活性和抵消液泡的低 pH，并且控制自由二价金属离子。β-甘油，原钒酸钠，邻菲罗啉构成磷蛋白磷酸酶抑制剂的混合物，该抑制剂被证明有利于维持细胞活性的特异性，如在 PM 水平的水分转运的活性[23]。氟化钠是一种磷脂酶抑制剂，加上 EGTA 和 EDTA，减少磷脂活性[24]。Leupeptin 是一种蛋白酶抑制剂。抗坏血酸是一种抗氧化剂，二硫苏糖醇是一种巯基保护剂。聚乙烯吡咯烷酮（ PVP ）被加入以吸附酚类化合物。组成见表 11-1。

（3）微粒缓冲液：微粒体颗粒悬浮在一种与分相方案兼容的缓冲液中。成分如表 11-2 所示。

(4) 分离相：用于 PM 分离的 2 个聚体分别是葡聚糖 T- 500 和聚乙二醇 3350，6.4 (*m*/*m*)。两相系统也含有 5mmol/L 磷酸钾（pH 7.8）起缓冲作用，蔗糖用来提供渗透势，KCl 用以修改相位。用于从拟南芥叶和根悬浮细胞分离质膜。相分离系统的成分组成见表 11-3（见注释 1 和注释 2）。

(5) PM 洗涤缓冲液：通过在洗涤缓冲液中稀释分离相来清洁 PM；组成成分见表 11-4。

(6) 镶嵌的 PM 蛋白用尿素-氢氧化钠处理提取：提取镶嵌蛋白质的缓冲液的组成见表 11-5 和表 11-6。尿素是用来作为离液剂。

(7) 溶解缓冲液：蛋白质在样品缓冲液（SB2X）中重悬溶解[25]（表 11-7）后进行 SDS - PAGE 电泳。DTT 被用来还原蛋白质。SDS 是除垢剂，用来溶解、变性和使蛋白带上负电荷。加入甘油以帮助样品上样。蛋白质在双向电泳溶液中重悬然后进行后续的双向电泳。硫脲是一种离液剂，尿素-硫脲混合物的超溶能力优于单独使用尿素。广泛的分析非离子型和两性离子去污剂表明，Triton X-100、β-十二烷基麦芽糖苷和 ASB14 可对二向凝胶疏水性蛋白质实现有效地复性[26,27]。溶解缓冲液一旦解冻，不要再重复冻结。

表 11-1　匀浆缓冲液

组分	混合	终浓度（mmol/L）
TRIZMA 碱	6.05g	50
蔗糖	167g	500
甘油	125.7g	10%（w/v）
EDTA-Na_2	100ml of 0.2mol/L 贮存液	20
EGTA	100ml of 0.2mol/L 贮存液	20
NaF	100ml of 0.5mol/L 贮存液	50
β-甘油磷酸	1.08g	5
Phenantroline	0.198g	1
PVP*b*	6g	0.6%（w/v）
维生素 C	1.76g	10
加水至	1L	

a 用 2-morpholinoethane sulfomicacid（MES）调整 pH 至 8.0，可在-20℃储存数月。只要在使用前加入 1mmol/L 的亮抑蛋白酶肽、5mmol/L 的 DTT 和 1mmol/L 的 Na-orthovanadate。

b PVP：平均分子质量为 30 000～40 000（ICN，参照 102 786）。

表 11-2　微粒体重是缓冲液[a]

组分	混合	终浓度（mmol/L）
磷酸缓冲液，pH 7.8	12.5ml of 0.2mol/L 贮存液	5
蔗糖	56g	330
DTT	154mg	2
NaF	10ml of 0.5mol/L 贮存液	10
加水至	500ml	

a 该微粒悬浮缓冲液可在－20℃储存数月。

表 11-3 质膜纯化的二相系统组分

组分	混合	终浓度（mmol/L）
Dextran T-500 20%（w/w）	11.82g	6.4%
PEG-3350 40%（w/w）	5.76g	6.4%
磷酸缓冲液 0.2mol/L，pH 7.8	0.9ml	5
KCl，2mol/l	0.09ml	5
蔗糖 1.6mol/L	6.74ml	300
加水至 27g		

a 2mol/L 氯化钾：在 500ml 的水中溶解 74.6g 氯化钾。可在－20℃储存数月。

b 1.6mol/L 蔗糖：在 500ml 的水中溶解 273.8 克蔗糖。可在－20℃储存数月。

表 11-4 质膜洗涤缓冲液组分[a]

组分	混合	终浓度（mmol/L）
TRIZMA 碱	1.21g	10
硼酸	0.61g	10
蔗糖	102g	300
KCl	0.67g	9
EDTA-Na_2	25ml of 0.2mol/L 贮存液	5
EGTA	25ml of 0.2mol/L 贮存液	5
NaF	100ml of 0.5mol/L 贮存液	50
加水至	1L	

a pH 应该是 8.3。如果过酸则用 TRIZMA® 调整；如果是碱则用 2-morpholinoethane sulfonic acid（MES）调整。PM 洗涤缓冲液等分，可在－20℃储存数月。PM 被存储在一个 PM 维持缓冲液中，该缓冲液由包括 10μmol/L 亮抑蛋白酶肽和 5mmol/L 二硫苏糖醇（见 3.1.2）的 PM 洗涤缓冲液组成。溶液现用现配。

表 11-5 缓冲液 A 组分[a]

组分	混合	终浓度（mmol/L）
TRIZMA 碱	1ml of 1mol/L 贮存液 pH 9.5	5
EDTA-Na_2	5ml of 0.2mol/L 贮存液	5
EGTA	5ml of 0.2mol/L 贮存液	5
尿素	48g	
加水至	200ml	

a pH 用 6N 氢氧化钠调整到 9.5，缓冲液可在－20℃储存数月。

表 11-6　缓冲液 B 组分[a]

组分	混合	终浓度（mmol/L）
TRIZMA 碱	1ml of 1mol/L 贮存液 pH 8.0	5
EDTA-Na_2	2ml of 0.2mol/贮存液 L	2
EGTA	2ml of 0.2mol/L 贮存液	2
加水至	200ml	

a 缓冲液可在－20℃储存数月。

表 11-7　2X 样品缓冲液组分[a]

组分	混合	终浓度
TRIZMA 碱	1.52g	0.125mmol/L
甘油	20g	20%（w/v）
DTT	3g	0.2mol/L
SDS	20ml of 20%贮存液	4%（w/v）
溴酚蓝	1mg	1%（w/v）
加水至	100ml	

a 样品缓冲液可在－20℃储存数月，DTT，二硫苏糖醇；SDS，十二烷基硫酸钠。

11.3　方　　法

11.3.1　质膜的分离

1. 分离微粒体部分

从机械破坏的叶、根组织或悬浮细胞中分离 PM 部分首先需要分离含有 PM 的微粒体膜部分。然后经过两相分离从微粒体部分分离质膜。所有的步骤在 4℃进行。

1）拟南芥的叶片和根

（1）迅速收集叶片和根，放在置于冰上的湿润的纸上，然后用冰冷的蒸馏水简单漂洗。称量材料的鲜重。匀浆液与组织的比例是 2∶1［介质（ml）/鲜重（g）］。全部的匀浆液加入组织，在华林搅拌器中低速匀浆 10s，然后高速离心 4 次每次 10s。

（2）所得匀浆用一个尼龙布（直径 100μm）过滤，以去除所有的细胞壁碎片。

（3）过滤后的匀浆在最高 26 000g 离心 25min，使叶绿体和线粒体沉淀。

（4）去除沉淀，用两张连续的滤纸（直径分别为 63μm 和 34μm）过滤上清液。

（5）在最高 84 000g 下离心 25min，可从上清液中得到微粒体沉淀。所得颗粒沉淀用总体积 9ml 的微粒缓冲液/20～40g 鲜重（表 11-2）重悬。

2）拟南芥悬浮细胞

（1）通过一个孔隙度 2 的玻璃纤维。悬浮细胞用冷洗涤缓冲液（1∶1，WBSC/悬浮细胞）（见 11.2.3 节 2）清洗。

(2) 称量材料的鲜重。

(3) 悬浮细胞在匀浆液中孵育 10min {2.5∶1，[介质 (ml) /鲜重 (g)]}。

(4) 细胞在华林搅拌器中预先低速匀浆 10s，然后在细胞破碎器中彻底破碎，使细胞在高压气体压力下研碎。通过施加的高压力 (0.54kbar) 使细胞通过一个直径 180μm 的压力隧道。从高压向低压转移期间细胞获得高速。通过空穴作用，发射的细胞含爆裂。

(5) 然后细胞匀浆在最高 10 000*g* 离心 10min。

(6) 上清液用直径 100μm 的尼龙布过滤。

(7) 在最高 50 000*g* 离心 35min，从上清液中得到 微粒体沉淀。沉淀重新用总体积 9ml 的微粒缓冲液/20～40g 鲜重 (见表 11-2) 重悬。

2. 两相分离法分离质膜

(1) 分离质膜与从拟南芥悬浮细胞、叶、根中分离 PM 用的是相同的方案。两相分离法受温度变化影响，所以最好始终在低温房间操作。

(2) 27g 相系统混合 9g 悬浮微粒 (最多相当于 40g 鲜重)。过度上样会影响相分离系统的准确性。

(3) 用力摇晃管子 15～20 次。确保管中物质混合均匀，葡聚糖要与微粒体悬浮液充分混合。

(4) 该系统通过离心 2000*g*，10min 分离成两个部分。PM 衍生的囊泡优先分布进入 PEG-上层相 (up1)，而来自其他膜的膜囊泡则分布进入下层相 (low1，图 11-1)。

(5) 为从上层相中纯化出 PM，该相被重新进行两相分离，得到下层相 (low2，图 11-1)。

(6) 通过 9g 微粒体缓冲液与 27g 两相分离体系混合得到上、下新层相。

(7) 在匀浆以 2000*g* 离心 10min 之后，得到两个新的层相 up2 和 low2。分别将 up1 和 low2 混合，low1 和 up2 混合。

(8) 经过其他的匀浆和离心步骤，得到了分出的相 up3、low3、up4、low4 (图 11-1)。

(9) 上层相 up3 被收集。

(10) 上层相 up4 与下层相 low3 混合在一起。

(11) 经过匀浆/离心，洗涤后的 up4 被收集。

(12) 在 60ml 洗涤缓冲液中稀释上层相 up3 和 up4，　(表 11-4)，然后在最高 85 000*g*进行沉淀离心 35min。针对叶片和根系悬浮细胞时，在最高 176 000*g* 粒化 30min 的情况下。

(13) 沉淀的 PM 蛋白质在加入了 10μmol/L 的亮抑蛋白酶肽和 5mmol/LDTT 的洗涤缓冲液中重悬，在液氮中速冻，可长期放于－80℃。

(14) 每 100g 鲜重蛋白质产量为 1.5～2.5mg (见注释 3)。

即使仔细地运用两相体系，彻底纯化也几乎是不可能的；因此，有必要通过其他膜和可溶性蛋白估计 PM 部分的相对污染 (见注释 4 和注释 5)。

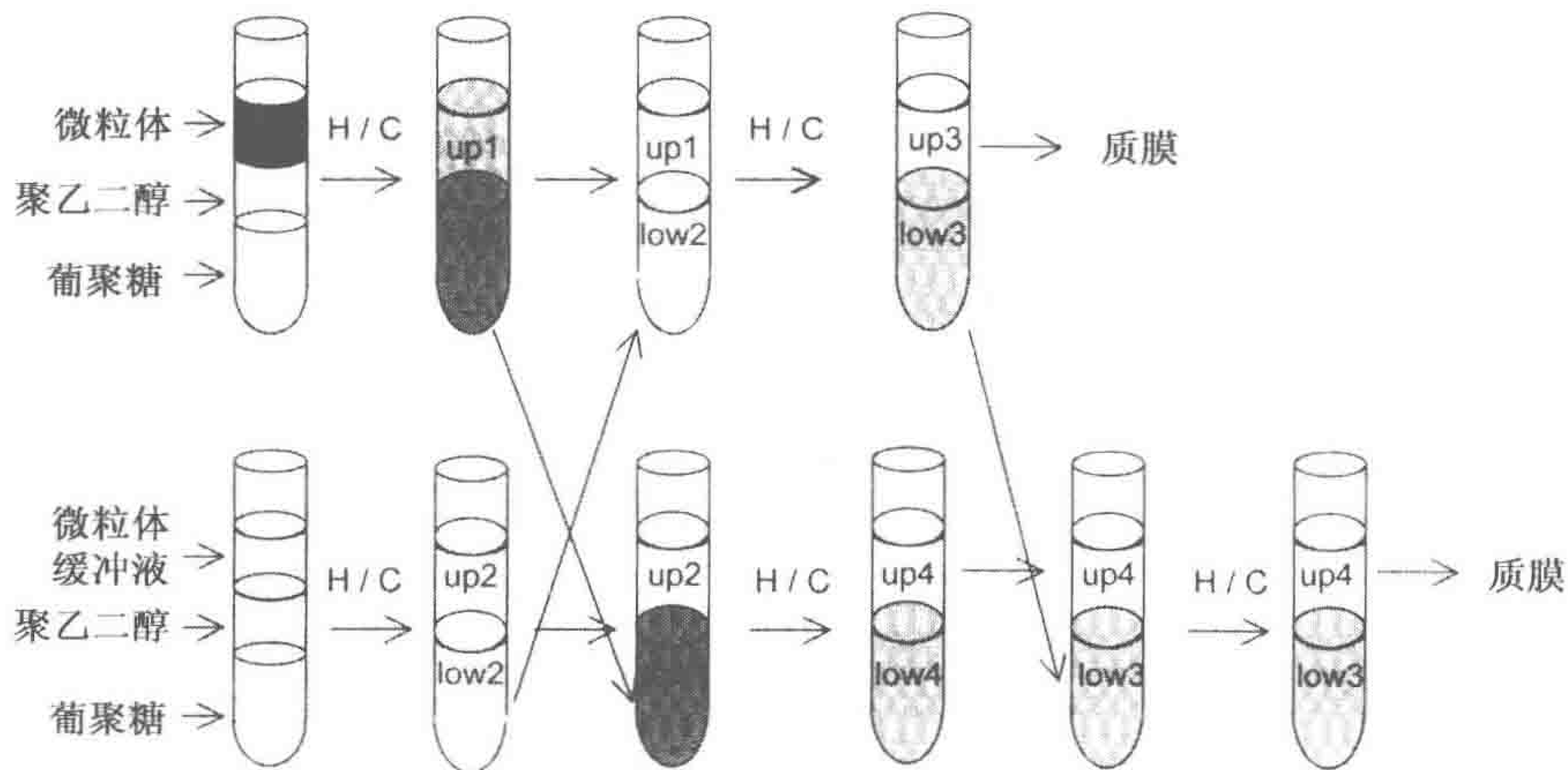


图 11-1　两相分离纯化 PM 示意图。微粒体用由聚乙二醇 3350 和葡聚糖 T-500（见 11.3.1 节 2）组成的两相分离系统混合（表 11-3）。在匀质化和离心（H/ C ）后，上层和下层的相分别变为富含 PM 和内膜。每一相（ up1 和 low1 ）利用补入新相再次富集（ up2 和 low2)。收集上层相 up3。上层相 up4 在收集之前洗涤

11.3.2　富集疏水性蛋白质

在碱处理中，对 PM 膜的尿素-氢氧化钠处理使得疏水性蛋白水通道蛋白得到更好的复性（见注释 6 和图 11-2 ）。

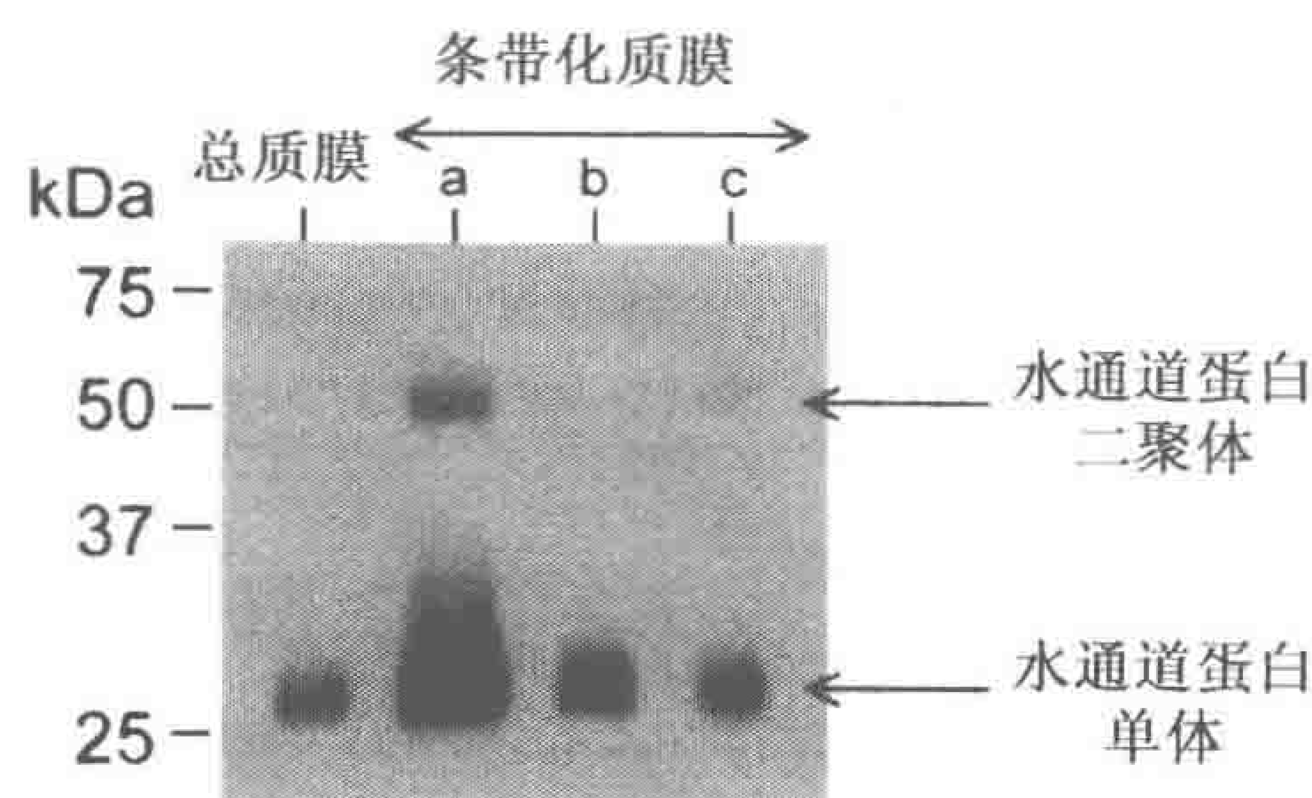


图 11-2　检测拟南芥根的质膜中水通道蛋白 PIPs。总质膜（PM）和尿素氢氧化钠处理的 PM（泳道 a)（见 11.3.2 及注释 6)，碳酸盐洗涤（泳道 b)[8] 和 0.2%（m/V）Triton X-100（泳道 c)[5] 分别用 SDS-PAGE（11%丙烯酰胺凝胶）和抗 PIP2；1 标记的抗体分离[13]。每泳道上样 10μg 蛋白质。28kDa 处的免疫检测信号对应单体形式的水通道蛋白。50kDa 处的信号对应二聚体形成的水孔蛋白。尿素、氢氧化钠处理可增强免疫共沉淀信号

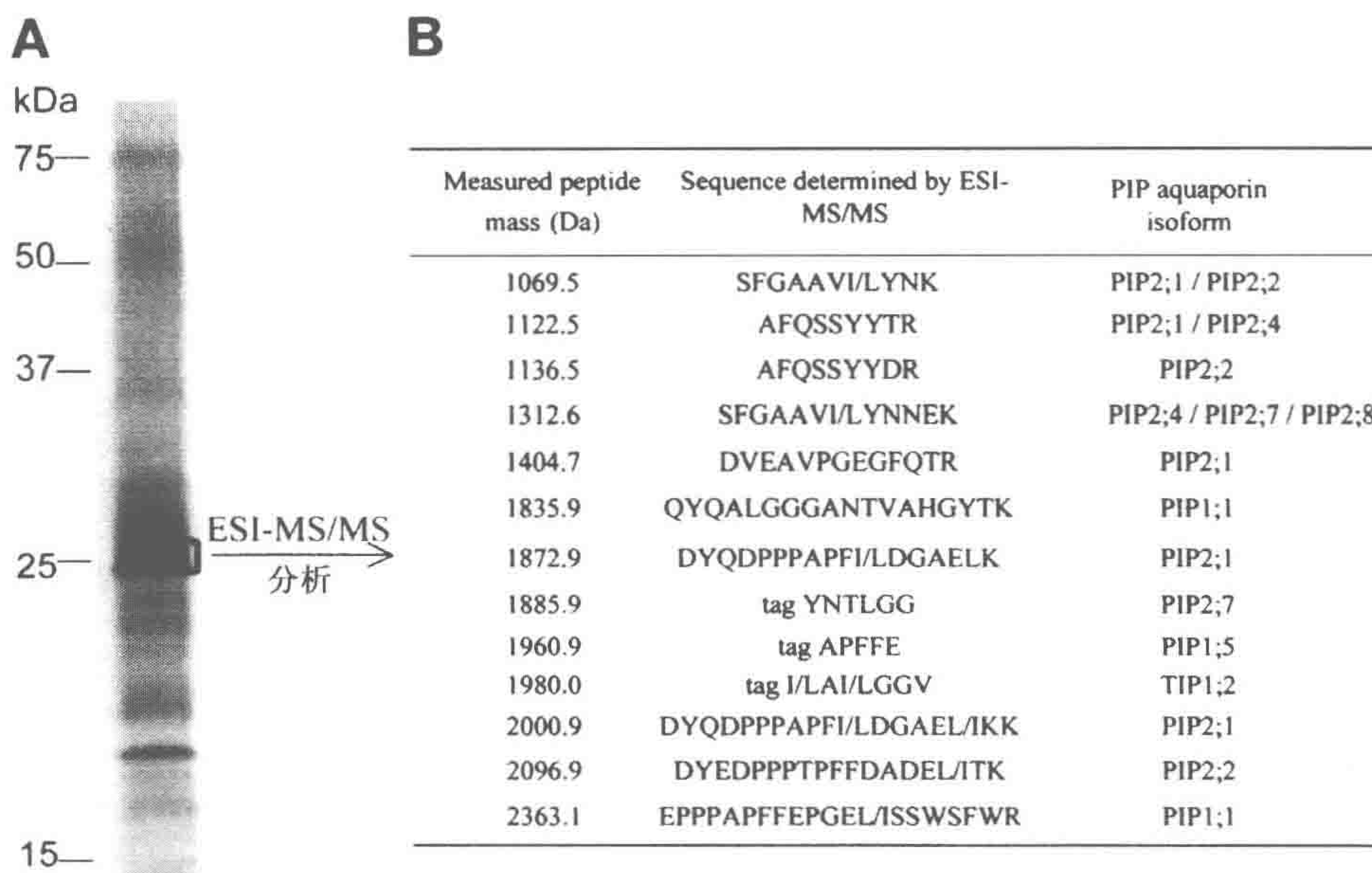
(1) PM 蛋白（ 0. 5mg）在 15ml 的缓冲液 A 中（见表 11-5）于冰上 5min，然后在最高 100 000*g* 条件下离心 10min。

(2) 弃去上清液，得到的沉淀在 20mmol/L NaOH 中重悬并且在最高 100 000*g* 离心 10min。

(3) 沉淀的蛋白质用缓冲液 B（表 11-6）洗净，然后在最高 100 000*g* 下离心 10min。

(4) 最后得到的沉淀在 PM 保存缓冲液（表 11-4）中重悬进行蛋白质实验。（见注释 3）。

(5) PM 蛋白部分由样本缓冲液 SB2X（表 11-7 ）稀释两倍后进行 SDS-PAGE 电泳（图 11-3 和见注释 7）。



Measured peptide mass (Da)	Sequence determined by ESI-MS/MS	PIP aquaporin isoform
1069.5	SFGAAVI/LYNK	PIP2;1 / PIP2;2
1122.5	AFQSSYYTR	PIP2;1 / PIP2;4
1136.5	AFQSSYYDR	PIP2;2
1312.6	SFGAAVI/LYNNEK	PIP2;4 / PIP2;7 / PIP2;8
1404.7	DVEAVPGEGFQTR	PIP2;1
1835.9	QYQALGGGANTVAHGYTK	PIP1;1
1872.9	DYQDPPPAPFI/LDGAELK	PIP2;1
1885.9	tag YNTLGG	PIP2;7
1960.9	tag APFFE	PIP1;5
1980.0	tag I/LAI/LGGV	TIP1;2
2000.9	DYQDPPPAPFI/LDGAEL/IKK	PIP2;1
2096.9	DYEDPPPTPFFDADEL/ITK	PIP2;2
2363.1	EPPPAPFFEPGEL/ISSWSFWR	PIP1;1

图 11-3 对胰蛋白酶切割的 28kDa 条带进行质谱（MS）分析[13]。(A) 用尿素和氢氧化钠处理 PM 的 SDS-PAGE 分析。上样 200μg PM 蛋白样品至凝胶上，电泳，并且以考马斯 G-250 染色显色。括号显示切除的条带。(B) 电喷雾（ESI）-MS/MS 分析 SDS-PAGE 电泳中由质膜内膜（PIP）为抗体免疫共沉淀的条带[13]。不同水通道蛋白的亚型存在于 28kDa 的条带中（见注释 7）

11. 3. 3 双向凝胶电泳分离蛋白质

1. 蛋白质的溶解

(1) PM 蛋白（120μg；全部的 PM 或经尿素氢氧化钠处理的 PM）在最高 100 000*g* 富集 15min。

(2) 富集沉淀在 350μl 的双向电泳溶液（表 11-8）中重悬，不断摇动 1h。

(3) 在 10 000g 离心 10min 后，小心收集上清液，用双向电泳溶液调整至 350μL（表 11-8）。

表 11-8　双向电泳溶液组分

组分	混合	终浓度
去垢剂[a]	1g	2% (w/v)
尿素	21g	7mol/L
硫脲	7.6g	2mol/L
Triton X-100	0.25g	0.5% (w/v)
Pharmalytes (3-10)[b]	0.6ml	1.2% (w/v)
DTT	0.16g	20mmol/L
加水至	50ml	

a 去垢剂是 β-dodecylmaltoside (sigma) 或 ASB14 (Calbiochem)。

b Pharmalytes 为 Amersham 产品 (cat. no. 17-0456-01)。

2. 2D 凝胶电泳

(1) 用商业化的固定 pH 梯度胶条（线性或非线性 pH 梯度 3～10，18cm 长；Amersham Pharmacia Biotech）进行等电聚焦（IEF）实验，使用 IPGphor 设备（Amersham Pharmacia Biotech）。

(2) 胶条在 350μl 的样品蛋白质上样后重新水化，被动水化 4h，然后在恒定电压（50V）条件下主动水化 7h。

(3) 胶条在如下条件下聚焦：从 0～300V，1min；300V 3h；300～3500V，1h，3500V，80kV · h。

(4) IEF 之后，胶条继续在含有 2%DTT 和 2.5% 巯基乙醇的平衡液里室温下平衡（根据 Chevallet 等，注释 26）。

(5) 二向电泳（SDS-PAGE）在均匀的 11% T 凝胶（Protean II，Bio-Rad）中进行。

(6) 胶条用低熔点的琼脂糖[28]密封在电泳凝胶的上方。

(7) 电泳：20mA，1h，然后在 40mA，4～5h。

(8) 为了方便其后的质谱分析，凝胶分别用银染或考马斯 G-250 进行染色（图 11-4 和图 11-5，见注释 8）。

11.4　注　　释

(1) 制备葡聚糖 T- 500：由于右旋糖酐 T- 500 易潮，必须检测提取浓度。首先，220g 葡聚糖 T- 500 溶解在 780g 水中轻微摇动。完成溶解大约需要 2h。然后 5g 的溶液溶解在 25ml 水中并且在 589nm 测量旋光度，作为具体的旋光度是＋199 °/ml/g/dm，终浓度（%，m/m）由以下公式得出：旋光度× 25 ×100/199× 5。

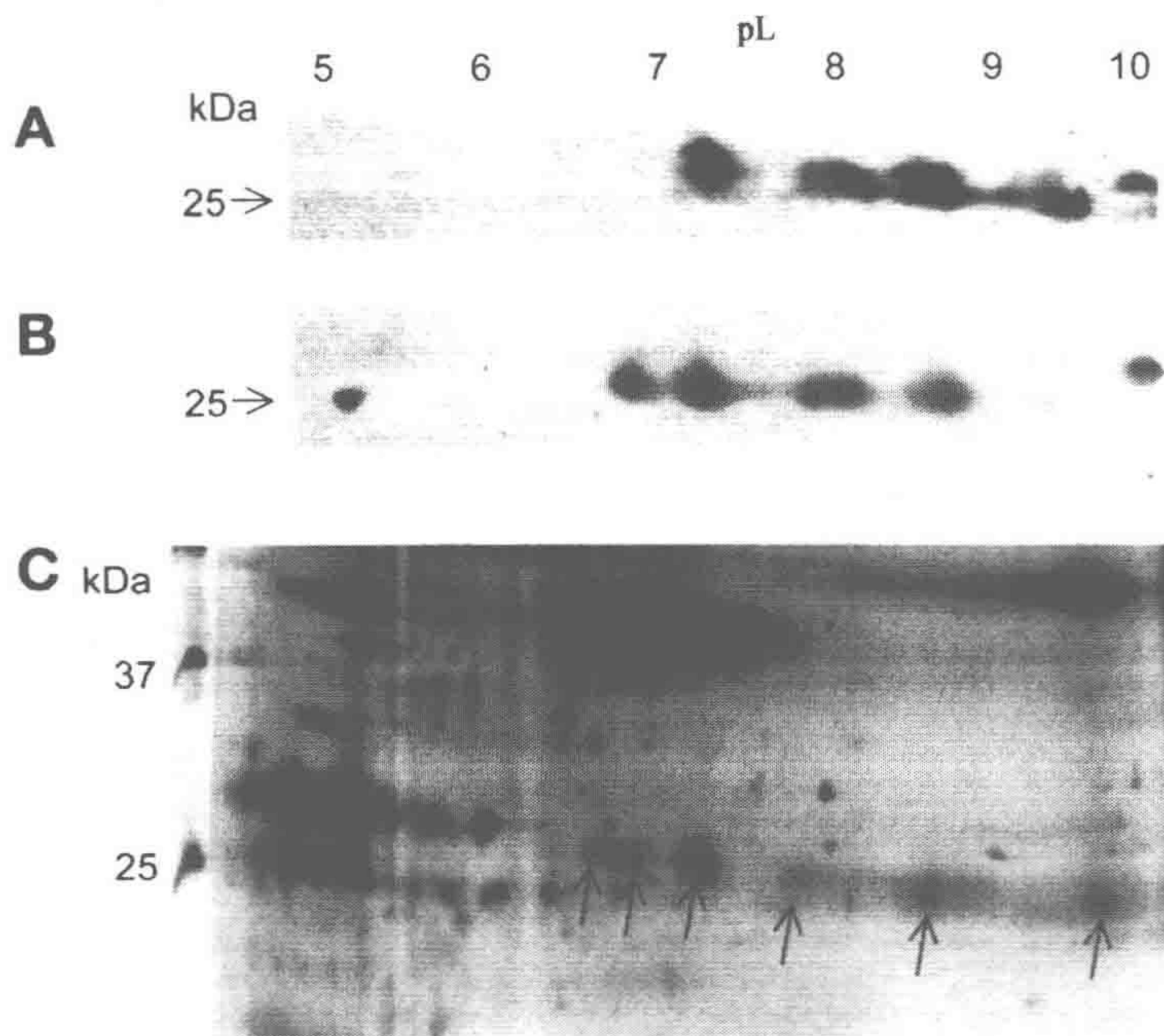


图 11-4　双向凝胶电泳分离的蛋白质显示出拟南芥根的 PM 中多种形式的水通道蛋白的表达。蛋白溶解按 11.3.3 节 1 描述的进行。双向凝胶电泳按 11.3.3 节 2 中所描述的进行。使用 3～10 线性梯度凝胶[13]。(A) 抗体特异识别 PIP1，一个水通道蛋白单体能够识别 4 个 PIP1 同源蛋白，但免疫共沉淀得到至少 7 点。(B) 用 PIP2 抗体得到了类似的结果，抗体可以识别 3 个 PIP2 同源蛋白但发现至少有 6 个不同的蛋白点。这些结果表明，修饰后的 PIP1 和 PIP2 的同源蛋白，包括没有修饰的，存在于根的 PM 样品中。(C) 几个免疫共沉淀得到的蛋白点为银染凝胶所显示的蛋白质，并且各标注了一个箭头。MALDI-TOF-MS 对这些点的分析已经确认 PIP 水通道蛋白在这些点中的存在[13]。

为了确保用于一系列的实验的葡聚糖 T- 500 的一致性，一次要多制备一些，尤其是如果没有用旋光计校正葡聚糖的含水量，这点变得十分必要。在这里，贮存液是由含水量为 5%的葡聚糖 T- 500 制备而成。不同批次的葡聚糖 T- 500 的分子质量也有差异。这意味着，不同批次的葡聚糖 T-500，对层相分离系统的能力需要进行重新评估，并对层相分离系统组成进行必要的调整。

(2) 层相分离系统的贮存液分装后贮存于－20℃。两相体系的构成以重量为基准，其体积取决于系统要承载多少膜材料。如表 11-3 显示了如何建立一个 27g 的样本系统，并且该系统将与其后的 9g 微粒体混合，从而最后形成 36g 层相分离体系。准备后，两相系统可以贮存在－20℃。

(3) 蛋白质浓度用改进的 Bradford 步骤[29]估算并且以牛血清白蛋白作为蛋白质的标准。

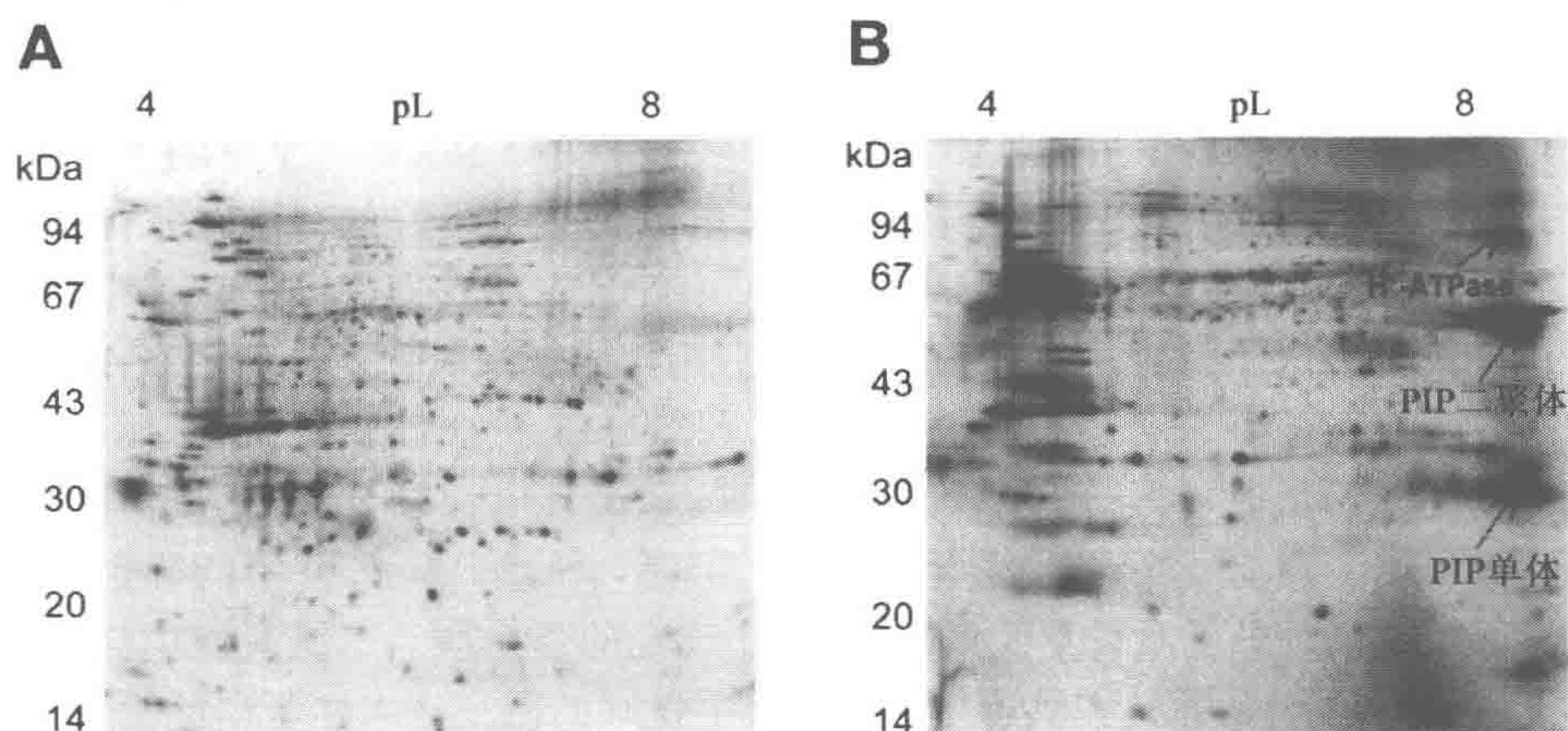


图 11-5　拟南芥叶子中总质膜蛋白（A）和经尿素-氢氧化钠处理后的质膜蛋白（B）双向电泳图谱。蛋白溶解参见 11.3.3 节 1。双向电泳程序参见 11.3.3 节 2。使用 pH3～10 非线性 IPG 胶条，使用胶状考马斯亮蓝 G-250 染色。箭头指示经尿素-氢氧化钠处理后质膜中高丰度的水通道蛋白（单体和二聚体）和 ATPase（H^+-ATPase）。蛋白质通过免疫检测和质谱分析鉴定。

（4）两相体系的应用：本章描述的两相分离步骤适应于拟南芥的叶片、根系和悬浮细胞。应用于任何其他植物材料时需要修改相分离的组分。可通过改变聚合物浓度和该相体系的盐组成来实现最优分离条件。选用绿色组织体为实验材料可以直接用肉眼观察细胞内膜在层相分离系统中的分离情况，从而迅速判断最佳聚合物和盐浓度。作为一个起点，大规模的实验应该根据本章描述的步骤来开展。如果上层相 up3 和 up4（图 11-1）是绿的，在不改变 KCl 浓度的前提下，需要准备一系列的小层相分离系统（在表 11-3 介绍的 10 %的相系统）。应在较低的相中选择分离叶绿素的最低聚合物浓度。另一方面，如果上层相 up3 和 up4（图 11-1）是白色，并且只有非常低的蛋白质产量，那么应应该选用较低浓度的聚合物进行层相分离。据 Widell 和 Larsson[30] 选择合适酶标准进行检测，来评估 PM 部分的纯度（见注释 5）。

（5）PM 纯度标准：由于蛋白质组学不是静态的，因此借此来评估质膜的纯度是件困难的事。此外，由于质膜具有一定的可塑性，即使在同一组织的不同发育阶段或外界环境变化或由一种细胞器转运到另一种细胞器中的蛋白质组图谱都有可能发生变化。尽管如此，特异酶标准可以粗略评估其他膜的存在情况。本章不重点阐述此评估方法，具体参见 Widell 和 Larsson[30]。Mg-ATPase 对钒酸盐、寡霉素和硝酸钾的敏感度被广泛检测质膜、线粒体和液泡膜的存在。IDPase 的活性用于检测高尔基体膜的存在，采用本章介绍的方案提取的质膜表现出对钒酸盐、寡霉素和硝酸钾不同的敏感度，分别占总 ATPase 活性的 83%、低于 1%和 13%。IDPase 的活性占总 ATPase 活性的 4%[4,13,33]。

（6）采用不同提取方法得到的质膜疏水性蛋白通过蛋白质组学分析在质量和数量上均有差异，这表明不同的提取方法适合不同特定的质膜疏水性蛋白[5]。特别是与去垢剂（Triton X - 114，单独使用 Triton X - 100 和 Triton X-100 与机溶剂配合使用）相比，

碱处理使 PM 疏水蛋白更好地复性[5]。与碱性处理比较显示，碳酸处理 PM[8]（30%）比尿素氢氧化钠处理（20%）得到了较高的蛋白质产量，但免疫检测显示后者的处理可得到更丰富的疏水性水通道蛋白（图 11-2 ）。

（7）由于 SDS 高的溶解效率，SDS-PAGE 电泳仍然是最好的分离疏水性蛋白质的方法之一。质谱分析可以鉴定 SDS-PAGE 条带中的蛋白质，即使同一条带中包含几种蛋白质也能成功鉴定。因此，用 ESI-MS/MS 分析用尿素氢氧化钠处理的 PM 的 28 kDa 的条带时显示存在至少 5 个水通道蛋白亚基（图 11-3）。这一结果揭示了质谱的强大，能够把高度同源的蛋白质区分开来。因而，SDS-PAGE 电泳结合质谱分析构成一种有效的策略，可用于建立一个疏水性蛋白质库。但是，SDS-PAGE 并不能确定鉴定到那些经过翻译后修饰，分子质量不变但等电点 pI 改变的蛋白质。二维凝胶电泳技术可以帮助补充这个不足[13]，并且提供了在二维凝胶上良好的恢复疏水性蛋白的手段（图 11-4）。

（8）溶解缓冲液的对比分析显示提取步骤不同的去垢剂效率不同。特别是，芳香核心的去垢剂（例如 C8 φ）显示去油脂效果不佳，但可有效打破蛋白质聚合[5,27]。相比之下，线性去垢剂（例如 ASB14 ）可有效地去油脂，但不能打破蛋白质的聚合[5,27]。在一个优化的步骤中，疏水颗粒的蛋白质溶解于尿素、硫脲和去垢剂同时存在的溶液里，可以是 β - dodecylmatoside 或 ASB14（表 11-8 和图 11-5）。第 12 章对疏水蛋白质溶解步骤进行标准评价。

参考文献

1. Hodges, T. K. and Mills, D. (1986) Isolation of the plasma membrane. *Methods Enzymol.* **118,** 41–54.
2. Bardy, N., Carrasco, A., Galaud, J. P., Pont-Lezica, R., and Canut, H. (1998) Free-flow electrophoresis for fractionation of *Arabidopsis thaliana* membranes. *Electrophoresis* **19,** 1145–1153.
3. Larsson, C., Widell, S., and Kjellbom, P. (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* **148,** 558–568.
4. Santoni, V., Rouquié, D., Doumas, P., et al. (1998) Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane. *Plant J.* **16,** 633–641.
5. Santoni, V., Kieffer, S., Masson, F., Desclaux, D., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21,** 3329–3344.
6. Ferro, M., Salvi, D., Rivière-Rolland, H., et al. (2002) Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99,** 11,487–11,492.
7. Marmagne, A., Rouet, M. A., Ferro, M., et al. (2004) Identification of new intrinsic proteins in *Arabidopsis* plasma membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics* **3,** 675–691.
8. Santoni, V., Rabilloud T., Doumas P., et al. (1999) Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20,** 705–711.

9. Millar, A. H. and Heazlewood, J. L. (2003) Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **131,** 443–453.
10. Fujiki, Y., Hubbard, A. L., Fowler, S., and Lazarow, P. B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol*. **93,** 97–102.
11. Hasler, L., Walz, T., Tittmann, P., Gross, H., Kistler, J., and Engel, A. (1998) Purified lens major intrinsic protein (MIP) forms highly ordered tetragonal two-dimensional arrays by reconstitution. *J. Mol. Biol*. **279,** 855–864.
12. Fotiadis, D., Jenös, P., Mini, T., et al. (2001) Structural characterization of two aquaporins isolated from native spinach leaf plasma membranes. *J. Biol. Chem*. **276,** 1707–1714.
13. Santoni, V., Vinh, J., Pflieger, D., Sommerer, N., and Maurel, C. (2003) A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem. J*. **373,** 289–296.
14. Sarioglu, H., Lottspeich, F., Walk, T., Jung, G., and Eckerskorn, C. (2000) Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis* **21,** 2209–2218.
15. Packer, N. H., Pawlak, A., Kett, W. C., Gooley, A. A., Redmond, J. W., and Williams, K. L. (1997) Proteome analysis of glycoforms: a review of strategies for the microcharacterisation of glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **18,** 452–460.
16. Towbin, H., Özbey, Ö., and Zingel, O. (2001) An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **22,** 1887–1893.
17. Kimura, Y., Takaoka, M., Tanaka, S., et al. (2000) N^{α}-acetylation and proteolytic activity of the yeast 20S proteasome. *J. Biol. Chem*. **275,** 4635–4639.
18. Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21,** 1054–1070.
19. Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J. W., et al. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290,** 481–486.
20. Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414,** 872–878.
21. Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., et al. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*. **126,** 1–12.
22. Quigley, F., Rosenberg, J. M., Shachar-Hill, Y., and Bohnert, H. J. (2002) From genome to function: the *Arabidopsis* aquaporins. *Genome Biol*. **3,** 1–17.
23. Gerbeau, P., Amodeo, G., Henzler, T., Santoni, V., Ripoche, P., and Maurel, C. (2002) The water permeability of *Arabidopsis* plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J*. **30,** 71–81.
24. Whitman, C. E. and Travis, R. L. (1985) Phospholipid composition of a plasma membrane-enriched fraction from developing soybean roots. *Plant Physiol*. **79,** 494–498.
25. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **222,** 680–865.
26. Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., et al. (1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19,** 1901–1909.

27. Luche, S., Santoni, V., and Rabilloud, T. (2003) Evaluation of non-ionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3,** 249–253.
28. Adessi, C., Miege, C., Albrieux, C., and Rabilloud, T. (1997) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18,** 127–135.
29. Stoscheck, C. M. (1990) Quantitation of proteins. *Methods Enzymol.* **182,** 50–68.
30. Widell, S. and Larsson, C. (1990) A critical evaluation of markers used in plasma membrane purification, in *The Plant Plasma Membrane–Structure, Function and Molecular Biology* (Larsson, C. and Moller, I. M., eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 16–43.
31. Masson, F. and Rossignol, M. (1995) Basic plasticity of protein expression in tobacco plasma membrane. *Plant J.* **8,** 77–85.
32. Santoni, V., Vansuyt, G., and Rossignol, M. (1990) Differential auxin sensitivity of proton translocation by plasma membrane H^+-ATPase from tobacco leaves. *Plant Sci.* **68,** 33–38.
33. Santoni, V., P, D., Rouquié D, Mansion M, Rabilloud T, and Rossignol, M. (1999) Large scale characterization of plant plasma membrane proteins. *Biochimie* **81,** 655–661.

第12章 双向电泳前去垢剂和离液剂对蛋白质的增溶作用

Thierry Rabilloud，Sylvie Luche，Veronique santoni，Mireille Chevallet

摘要 由于双向凝胶电泳对总蛋白具有杰出的分离能力，因此它能应用于所有类型蛋白质的分离。然而蛋白质的溶解性严重阻碍了许多种类蛋白质分析，尤其是膜蛋白的研究。主要是在提取和等电聚焦步骤出现这些问题，解决办法是设法改进在等电聚焦前溶解蛋白质的样品溶液。样品溶液经过离液剂和新去垢剂处理，从而提高蛋白质的溶解度。在膜蛋白质组学分析时加入这些化合物，是现在以及未来的讨论方向。

关键词 疏水蛋白；膜蛋白；蛋白溶解；等电聚焦；离液剂 ；去垢剂；两性离子去垢剂

12.1 前 言

以双向电泳为基础的蛋白质组学研究中，蛋白质的溶解是一项艰巨的任务。举例来说，蛋白质必须达到它们的 pI，并且在这个 pI 保持可溶性，pI 也是溶解度的最低限度。此外，当蛋白质接近它们的 pI 值时，蛋白质的流动性下降，在强烈的电场中（200V/cm，与用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 10～20V/cm 相比并不罕见）蛋白质进行等电聚焦（IEF）。反过来意味，一般的盐类和离子化合物在 IEF 中几乎被排除。此外，在 IEF 之前使用的任何溶剂，不得改变蛋白质原有的 pI。因此，这排除了使用强离子去垢剂如 SDS。然而，少量的［0.03 %（m/V）以内］离子去垢剂还是可以用，提供 SDS 与其他非离子去垢剂相互交换的条件，这确保去除了与蛋白质紧密结合的 SDS，但在等电聚焦过程中 SDS 的用处也损失了。因此，建议在 IEF 之前蛋白样品彻底溶解之后作用 SDS。

抛开这些由于蛋白质自身性质而产生的问题不说，许多生物样品中存在的问题源于样品中存在的非蛋白类化合物。典型的例子是，核酸浓度过高时完全模糊了双向电泳图谱[4]。核酸在低离子强度的 IEF 中起着移动离子交换的作用从而造成假象。其他类别的化合物（脂类，盐等）也会在蛋白样品电泳图谱中产生假象。尤其是植物样品，因为植物组织能合成一系列具有不同结构的化合物。举例来说，在一些植物组织中酚类物质和叶绿素是非常丰富的，在蛋白质组学技术中有时能完全破坏蛋白质的分离提取。

因此根据初始材料的不同存在不同的问题。当从整个组织开始时，普遍面临的主要问题是非蛋白化合物所产生的干扰。这些方面将在本书的其他章节描述。本章将侧重于其他方面的问题，如镶嵌蛋白的溶解，和主要解决用于蛋白质初步溶解和 IEF 的离液

剂和去垢剂。

如前所述，IEF 中的制约因素限制了化学药品的选择，在 pH 波动范围内样品溶液不能有净电荷产生，如非离子型或两性离子化合物。这限制了酰胺和尿素类离液剂的选择，胍和脒在 pH 12 以下是带电荷的。尿素作为可行的离液剂已经使用了很长一段时间了。最近，加入硫脲的尿素离液剂不仅增加蛋白溶解性[5]但而且还限制蛋白酶活性[6]。在溶解过程中离液剂的作用是打破样品中的各种分子非共价的相互作用（如氢键，偶极-偶极的相互作用，以及疏水相互作用）并且使蛋白质展开。虽然离子键不受非离子型离液剂如尿素和硫脲直接影响，这些离液剂对水的电容率的影响也改变离子键的强度。

去垢剂方面，不带电荷的去垢剂的效率比离子的显然少得多，这是很清楚的。离子去垢剂，使蛋白质分子穿了一件带电“外套”，从而使蛋白质-去垢剂复合物通过离子相互排斥，从而防止蛋白的聚集。然而离子去垢剂不能用于 IEF 的二向分离。不过，它们可以用在分区电泳方法中，本章将会给出一个简短的例子。

广泛的商业非带电去垢剂的选择中，共有两个亚类。非离子型去垢剂分子不带电荷，而两性离子去垢剂分子上有同等数量的正负电荷。根据分子的可电离基团 pK，一些去垢剂可以在一定的 pH 范围内离子化（其中至少有一个基团被滴定）在另一 pH 范围内两性离子化，而其他去垢剂则在完整的 pH 范围才被两性离子化。举一个说明两种情况的例子，当羧酸基团没有充分去质子化，甜菜碱（带有四铵盐和羧酸基团）在低 pH 下会带上正电荷；当羧酸基团完全被去质子化后，如超过 pK 2 pH 单位以上，它们即成为一个两性离子去垢剂。相比之下，磺基甜菜碱，带有四铵盐和磺酸基团，在 0～14 的 pH 范围是两性离子，因为两个基团在这个范围内都电离。事实上，去垢剂只有在 pH 范围内完全电离为两性离子才可用于 IEF。

两种传统用于双向电泳的去垢剂是非离子型去垢剂 Triton X-100（或 NP-40）和两性离子去垢剂 3［3-cholaminoproply diethylammonio］-1-propane sulfate（CHAPS）。两种去垢剂都已尿素结合广泛使用，但没有被证明在溶解难溶性蛋白质（如膜蛋白）方面非常有效[7]。然而，最近的工作表明，无论是特别设计的两性离子去垢剂[8~10]，或精心选择的非离子型去垢剂[11]都可以溶解膜蛋白。有趣的是，Triton X-100 只与尿素合用不如与尿素-硫脲合用更有效[11]。这个发现已延伸到其他低聚乙二醇去垢剂家族，如 Brij® 去垢剂，如线性烷基寡聚乙二醇化合物[11]。然而，最有效的非离子型去垢剂属于糖苷家族（如辛基葡萄糖苷、十二烷基麦芽糖苷），而后者在单独与尿素使用[12]和与尿素-硫脲使用[11,13]同样有效。由于不同去垢剂的选择而引起蛋白质溶解多样化的例子见图 12-1。溶解过程中发挥作用的多种变量在参考文献 14 中也有研究。尽管如此，我们并不能因为前文讨论就认为十二烷基麦芽糖苷就是双向电泳中蛋白溶解的最好的去垢剂。虽然去垢剂的选择取决于蛋白样品自身的特性，但是根据之前的实验结果，还是有些可作为常用去垢剂用于蛋白质溶解，例如十二烷基麦芽糖苷、ASB14、$C7B_2O$、Brij56 和 C13E10，对于可溶性蛋白，CHAPS 是很好的选择。

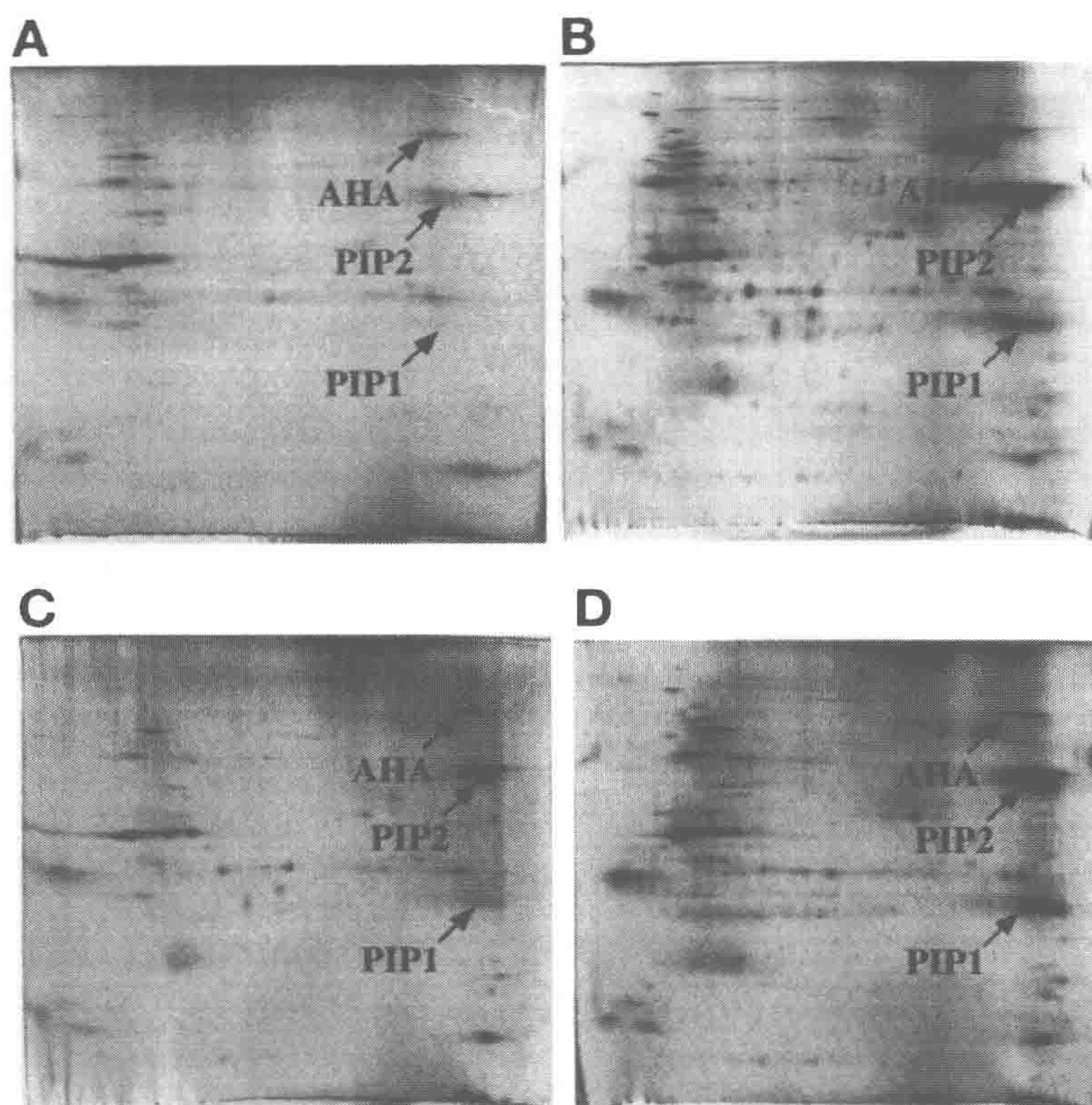


图 12-1　双向电泳分离拟南芥叶质膜蛋白质。蛋白上样量为 60μg。双向电泳第一向选用 pH3～10 线性胶条，第二向丙烯酰胺浓度为 10%。箭头所指为 H^+-ATPase（AHA），水通道蛋白单体（PIP1）和水通道蛋白二聚体（PIP2）。提取的质膜蛋白用含有 7mol/ L 尿素，2mol/L 硫脲，20mmol/LDTT，0.4%两性电解质和（A）4%CHAPS，（B）2%十二烷基麦芽糖苷，（C）2% $C7B_2O$，（D）2% ASB14。

12.2　材　　料

12.2.1　生物材料

拟南芥膜材料根据 Santoni 的方法（见第 11 章）制备。

12.2.2　设备

（1）桌上用超速离心机，用于膜的制备和去除不溶蛋白质。

（2）固相 pH 梯度胶条［固定 pH 梯度（IPG），线性和非线性，pH 梯度 3～10，长 18cm；Amersham Pharmacia Biotech］。

（3）IPGphor 装置：用于等电聚焦蛋白质（ Amersham Pharmacia Biotech）。

(4) 管胶电泳设备 (Bio-Rad),用于第一向凝胶电泳。

(5) ProteanII:用于 SDS-PAGE 电泳 (Bio-Rad)。

12.2.3 药品和贮存液

(1) 十二烷基麦芽糖苷,Triton X-100 和 CHAPS,最好是用 20% (*m/V*) 溶解于水的贮存液。这些贮存液应存放在 4℃并且标明有限的贮存期 (几个星期)。

(2) C13E10、Brij 56、ASB14,最好是用由 20% (*m/V*) 的溶解于乙醇/水 [50/50 (*V/V*)] 贮存液。这些贮存液在室温可以稳定贮存数月。

(3) 阳离子去垢剂 [十二烷基三甲基溴化铵 (DTAB),十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB),苯扎氯铵] 是用 20% (*m/V*) 的水溶贮存液。这些贮存液在室温下较稳定但是对温度非常敏感。它们有时在使用前需要在 37~40℃温浴以再溶解去垢剂。

(4) IEF 用的尿素贮存液。在室温下超过 9mol/L 的尿素是很难溶的,这是在尿素是唯一离液剂的情况下所用的浓度。这表明尿素以固体形式加入 (见注释 1)。

(5) 尿素-硫脲贮存液:离液剂的终浓度是 7mol/L 尿素和 2mol/L 硫脲。这意味着配制 1.25×浓度的贮存液,比重新为每个样品称取少量的固体尿素和硫脲要简单得多。如果配制 10ml 这种贮存液,称取 5.25g 尿素和 1.9g 硫脲。一些去垢剂 (如 CHAPS 或 Triton X-100) 是与尿素完全互溶的,可以在这个阶段加入。其他去垢剂与尿素的相容性有限 (如 ASB14),必须等到溶液最终溶解才加入。必须添加总体积 4.2ml 的液体到尿素和硫脲,以补足 10ml (见注释 2 和注释 3)。这个溶液可在 −20℃稳定贮存几个月。

(6) 用于区带电泳的尿素溶液:由于尿素使用时是 4mol/L 终浓度,因此配成 8mol/L 的贮存液很方便。配制 10ml,溶解 4.8g 尿素在 6.4ml 的水中。这个贮存液可在 4℃稳定 2~3 天。

(7) 用于区带电泳的酸性缓冲液:1mol/L 磷酸二氢钾磷酸盐+1μl/ml 85%磷酸。

(8) 三丁基膦 (TBP) 是一种液体 (纯的为 4mol/L)。在使用之前在二甲酯甲酰胺中稀释 40 倍,在样品溶液中进一步稀释 50 倍。

(9) 三羧乙基磷酸酯 (TCEP) 是一种固体。用水配制 1mol/L 贮存液,可在 −20℃稳定贮存数月。

12.3 方法 (见注释 4)

12.3.1 用于 IEF 的蛋白质样品在尿素中的溶解

1. 固体样品溶解 (如组织或细胞颗粒)

在这种情况下,在终端溶解体积中往往忽略样品的体积。样品溶液含有尿素 (终浓度 9~9.5mol/L;见注释 1),所选取的去垢剂 (依照 2.3.1 中列表) 终浓度为 2%~4% (*m/V*),两性电解质 [IPG:0.4% (w/v); [CA] -IEF:2% (w/v)],还原剂 (50mmol/L DTT 或 5mmol/L TBP 或 5mmol/L TCEP),将样品溶液加入固体样品中

进行溶解，在水溶条件下进行超声波 30min 会有助于蛋白质的溶解，通过高速离心 20000g，30min 去除不溶物质。

2. 蛋白样品从悬浮液或溶液中溶解

在这种情况下，必须考虑样品的体积。因此，有必要计算终体积。根据经验，样本量可以占最终提取体积的 35 %。固体尿素、水和去垢剂贮存液，两性电解质要一同加入蛋白样品中来溶解蛋白质。

12.3.2　蛋白样品在尿素硫脲中的溶解

定量的蛋白样品体积通过水化过程进入 IPG 胶条中，如果是自制的 IPG 胶条，则可以制成比商业产品更宽一些，这时蛋白样品可调整至更大体积（最多 1ml），这样就可以稀释被浓缩的离液剂和蛋白样品。如果去垢剂能预先溶解在浓缩的离液剂中，其中还包含还原剂，那么样品体积占总溶解体积的 2%，如果去垢剂必须在最后加入，并且尿素的浓度不超过 8mol/L，这样就很方便使用 1 份的样品，1 份的去垢剂贮存液和 8 份的浓缩离液剂。如果此方法使体积过大，可以用以下两种方法解决：

（1）在试管中加入相当于 1 份样品的去垢剂，在真空浓缩仪中进行浓缩后再加入 1 份样品和 4 份浓缩离液剂。

（2）考虑到样品体积占终体积的 40%，应称量相应量的尿素、硫脲和固体去垢剂，并且在冰浴条件下进行超声波溶解。所有情况下，蛋白样品先在室温下溶解 30～60min，再在 200 000g，30min 条件下离心去除不溶物质。

12.3.3　用于区带电泳的蛋白样品溶解

蛋白样品用 SDS 进行溶解不在本章中介绍，本章主要讲述蛋白样品在进行非对角电泳之前在尿素和阳离子去垢剂中的溶解情况[16,17]。计算样品溶解溶液中的组成很简单，蛋白样品占终溶解体积的 1/4，液体样品按如下顺序添加：0.4 体积的 20%（w/v）阳离子去垢剂贮存液，0.2 体积还原剂，0.4 体积磷酸缓冲液和 2 体积的 8mol/L 尿素。

混合后的样品溶液在水浴条件下超声处理 30min，然后在 10 000g，15min 条件下离心去除不溶物质。

12.4　注　　释

（1）尿素所占体积对于确定尿素溶液终浓度很有用。1g 尿素在溶液中占有 0.75ml 的体积。对于大多数去垢剂也是如此，1g 占 1ml 的体积，这也适用于硫脲。尿素不能加热至 37℃以上，防止氨甲酰化。例如，1ml 的液体中加入 900mg 尿素，就会得到 1.675ml 含 9mol/L 尿素的溶液。1g 尿素添加到 1ml 液体中，则产生 1.75ml 的 9.5mol/L 尿素溶液。

（2）事实上，大部分的这些提取液含低于 50%的水。这意味着，固体的溶解是相

当困难的，特别是因为不能使用高温（见前文注释）进行溶解。使用水浴超声仪（用于物品和玻璃器皿）对难溶问题有很大帮助。

（3）许多去垢剂不能完全与尿素互溶。不溶性的去垢剂-尿素复合物是否会形成，取决于去垢剂的结构和尿素浓度，以及温度。带有直链烷基的去垢剂链特别容易出现这个问题（如 ASB 14、Brij 56）。商业直链磺基三甲铵乙内酯不能容纳 4mol/L 以上浓度的尿素，因此不能使用。

（4）许多去垢剂强烈干扰一些常用的蛋白质测定方法，而这些方法有时也会受还原物质的干扰（见本书的相关章节），因此有必要把这方面的因素在蛋白质样品溶解过程中考虑进来。在有些情况中，蛋白样品虽然能在各种样品溶液中进行溶解但却总与蛋白检验方法相冲突。在这种情况下，我们建议使用原始蛋白样品进行蛋白浓度检测，特别是蛋白样品是悬浮液的情况。反过来，这也意味着无法评估溶解的效果。

参考文献

1. Weber, K. and Kuter, D. J. (1971) Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* **246,** 4504–4509.
2. Ames, G. F. L. and Nikaido, K. (1976) Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry* **15,** 616–623.
3. Remy, R. and Ambard-Bretteville, F. (1987) Two dimensional electrophoresis in the analysis and preparation of cell organelle polypeptides. *Methods Enzymol.* **148,** 623–632.
4. Heizmann, C. W., Arnold, E. M., and Kuenzle, C. C. (1980) Fluctuations of non-histone chromosomal proteins in differentiating brain cortex and cerebellar neurons. *J. Biol. Chem.* **255,** 11,504–11,511.
5. Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. (1987) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18,** 307–316.
6. Castellanos-Serra, L. and Paz-Lago, D. (2002) Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: evaluation of its efficiency in challenge experiments. *Electrophoresis* **23,** 1745–1753.
7. Santoni, V., Molloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21,** 1054–1070
8. Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., et al.(1998) New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19,** 1901–1909.
9. Rabilloud, T., Blisnick, T., Heller, M., et al. (1999) Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: comparison of the proteins extracted from normal or Plasmodium falciparum-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* **20,** 3603–3610
10. Tastet, C., Charmont, S., Chevallet, M., Luche, S., and Rabilloud, T. (2003) Structure-efficiency relationships of zwitterionic detergents as protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3,** 111–121.

11. Luche, S., Santoni, V., and Rabilloud, T. (2003) Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **3,** 249–253.
12. Witzmann, F., Jarnot, B., and Parker, D. (1991) Dodecyl maltoside detergent improves resolution of hepatic membrane proteins in two-dimensional gels. *Electrophoresis* **12,** 687–688.
13. Taylor, C. M. and Pfeiffer, S. E. (2003) Enhanced resolution of glycosylphosphatidylinositol-anchored and transmembrane proteins from the lipid-rich myelin membrane by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3,** 1303–1312.
14. Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* **21,** 3329–3344.
15. Sanchez, J.C., Hochstrasser, D., and Rabilloud, T. (1999) In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. *Methods Mol. Biol.* **112,** 221–225.
16. MacFarlane, D.E. (1989) Two dimensional benzyldimethyl-n-hexadecylammonium chloride-sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures. *Anal. Biochem.* **176,** 457–463.
17. Hartinger, J., Stenius, K., Hogemann, D., and Jahn, R. (1996) 16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins. *Anal. Biochem.* **240,** 126–133.

第 13 章　植物蛋白质组学中的双向电泳技术

Walter Weiss 和 Angelika Görg

摘要　利用固定 pH 梯度（IPGs）进行的双向凝胶电泳和质谱鉴定蛋白质技术是目前蛋白质组分析的主要技术。利用双向电泳可以将非常复杂的蛋白质混合物根据等电点、分子质量、溶解性和相对丰度分离开来并得到完整蛋白质的图谱。图谱反映了蛋白表达、异形体或翻译后修饰的变化。双向电泳可以同时分离超过 5000 个蛋白质（通常约 2000 个蛋白质），而且能够定量检测<1ng 的蛋白质点。如今采用 IPGs 的双向电泳已经克服了以前基于载体两性电解质的双向电泳中的一些限制，包括重复性，操作、分辨率、极端酸性和（或）碱性蛋白的分离。pH 2.5～12 的 IPGs 的发展使人们能够分析极端碱性的蛋白并建立相应的数据库。窄 pH 范围的 IPGs 提高了分辨率（$\Delta pI = 0.001$），并且配合预分离方法使用时可用于检测低丰度蛋白。本文介绍了一种目前在植物蛋白质组分析中广泛使用的双向电泳方法，并详细描述了该技术中的各个步骤。

关键词　固定 pH 梯度；植物；蛋白质组；双向电泳

13.1　前　　言

从 20 世纪 70 年代晚期以来，人们在不同的植物组织、器官、亚细胞结构和细胞器中开展了众多的寻找基因组表达差异（蛋白质组一词首次于 1994 年提出）的工作，以此来分析内部或外部刺激对蛋白表达模式的影响，如响应不同激素、化学药品或生物/非生物胁迫（如热、冷、干旱或臭氧），或是以此监控植物中不同生长发育阶段（如种子萌发、成熟或衰老）[1-5]。

除了研究由特定基因组表达产生的蛋白质组的变化外，不同基因组产生的蛋白质组的差异也被广泛的分析[2]。例如，根据对蛋白表达定性和定量变化的简约分析，人们评估了种群内部和种群之间的系统进化关系和遗传距离并用来建立遗传图谱和系统进化树[6]。另一种应用包括为了区别和鉴定关系相近的株系、品种[7]，杂交后代或突变体而进行的遗传多样性评估。第三个研究领域是鉴定质量相关的分子标记（如烘培、麦芽制造和酿造质量[8]），对植物病原（如真菌和病毒）的敏感性/抗性的标记和为植物育种定位数量性状基因（QTLs）[9]。在最近的研究中，研究范围不仅扩展到对病原的研究，而且扩展到植物和共生微生物互作（如豆科植物和固氮细菌），从食物中辨认和鉴定植物过敏原（如面粉过敏原[10]）（图 13-1），或评估基因改良植物的等质同源性等方面。更加全面的总结请读者阅读这些方面的综述[1-5]。

除了一些利用液相——质谱联用（LC-MS/MS）进行的植物蛋白质组分析外，以

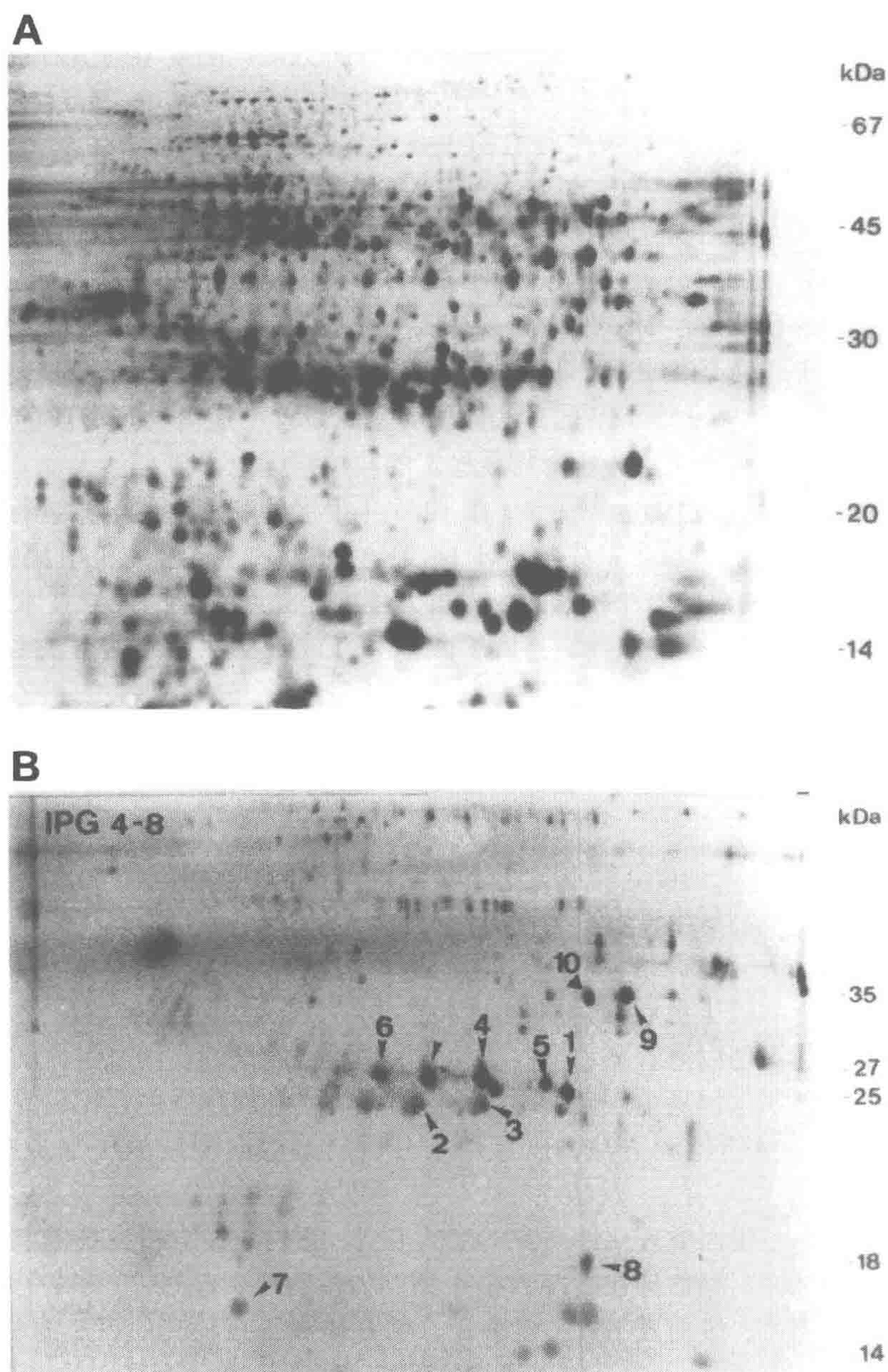


图 13-1　(A) IPG-Dalt 分离的可溶于 Tris-HCl 的小麦种子白蛋白/球蛋白。第一向：用 IPG 4～8 以及 Multiphor Ⅱ；样品在阳极（左侧）附近用上样杯上样。第二向：垂直 SDS-PAGE（13% T）。银染。(B) 可溶于 Tris-HCl 的小麦种子过敏原经 IPG-Dalt 分离后电转印至聚偏二氟乙烯树脂（PVDF）膜上。免疫显色使用患有面包师哮喘患者的血清（一抗），并使用碱性磷酸酶标记的抗人 IgE 作为二抗。主要的与 IgE 结合的蛋白质由箭头标出（依据参考文献［32］的许可）

上提到的研究中的绝大多数是基于双向电泳（2-DE）技术。双向电泳是——并且在可预见的将来仍将是——能够被常规化应用的用以分析大规模的复杂的蛋白质混合物（如整个细胞或组织提取物）的相应蛋白表达谱的唯一分析技术。与质谱（MS）鉴定蛋白质技术结合，双向电泳目前是蛋白质组的主要工具。双向电泳结合了等电聚焦（IEF）和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳（SDS-PAGE），根据两种不同的参数分离变性蛋白质，第一向根据等电点（pI）第二向根据分子质量（M_r）。在一定的凝胶尺寸和 pH 梯度下，双向电泳可以同时分离超过 5000 个蛋白质（通常约 2000 个蛋白质），而且在使用高灵敏度蛋白质检测方法时能够定量检测＜1ng 的蛋白质点（图 13-1）。同样重要的是，它能得到完整蛋白质的图谱。图谱反映了蛋白质表达、异形体或翻译后修饰的变化。与之相比，基于 LC-MS/MS 的方法分析的是肽段，不能得到蛋白质的分子质量和等电点的信息，而且进行定量分析时需要稳定的同位素标记。

最早的蛋白质组研究是由 O'Farrell 在 1975 年报道的利用双向电泳进行的研究[12]。该研究采用载体两性电解质形成的 pH 梯度进行第一向电泳。利用固定 pH 梯度（IPGs）作为第一向的双向电泳技术的引入很大程度上克服了双向电泳技术中的一些限制[13]，包括重复性、操作、分辨率、极端酸性和（或）碱性蛋白的分离和样品载量。IPGs 是基于两性 Immobiline^R 的应用。两性 Immobiline^R 是由 10 种有一定化学结构的丙烯酰胺衍生物组成的一系列试剂，其基本结构是 $CH_2=CH—CO—NH—R$。其中 R 基包含一个羧基或氨基。它们形成 pK1～13 的一系列缓冲体系。反应末端同丙烯酰胺一起聚合在凝胶结构中，这样就形成了非常稳定的 pH 梯度。在这样的梯度中能够进行真正的稳态等电聚焦并提高重复性。窄 pH 范围的 IPGs 不仅提高了分辨率（$\Delta pI = 0.001$），而且可以检测低丰度蛋白。同时，pH 为 12 的碱性蛋白质已经被人们利用 IPG 技术在真稳态状况下分离得到[14-17]。

其他技术方面的进步也同样为双向电泳技术在蛋白质组分析中的广泛应用做出贡献。这些进步包括：用以溶解疏水蛋白质的溶解性更强的试剂，用来半自动地平行运行多个凝胶的设备，用来提高重复性、蛋白点定量精确性和简化蛋白点比较的基于荧光染料的更加敏感的蛋白质检测方法，以及用来分析复杂双向凝胶的更加成熟的计算机软件[11]。

一般而言，由于蛋白质理化性质和丰度的多变，蛋白质组分析在技术上比基因组分析的风险更大。例如，据估计在高等真核生物（如植物）中超过 20 000 个基因。而由于不同的蛋白质剪接、蛋白质水解、磷酸化、糖基化和百余种其他可能的翻译后修饰，这些基因能翻译成 50 000～100 000 种蛋白质。幸运的是，在一个特定的组织和时间里，并不是所有这些蛋白质都会表达。不过，表达蛋白质的种类很可能至少为 10 000～20 000。而且，植物蛋白质组分析面临一些特殊的挑战。特别是蛋白质样品制备很困难。这是因为植物坚硬的细胞壁以及中央液泡中积累的大量的干扰化合物，如酚、色素和水解酶。这些物质在组织破碎过程中会造成蛋白质的降解和（或）沉淀[19,20]。另外，由于通常绿色植物组织中的蛋白质含量很低（一般为 2%，而哺乳动物组织或微生物细胞中大约是 20%），经常需要使用富集蛋白质的方法。

尽管有上述的不利因素，2-DE-MS 已经被成功地运用到整个植物组织和亚细胞水

平的蛋白质组分析中。经典的2-DE-MS的主要流程有：①样品制备/预分离和蛋白质溶解；②用双向电泳分离蛋白质；③蛋白质检测和定量；④计算机辅助分析双向电泳图谱；⑤质谱鉴定蛋白质；⑥双向蛋白质数据库构建。本文的余下部分将重点描述基于IPGs的双向电泳技术（方法1）；在此其他方法将不予讨论。关于这些方面，读者可以查阅本书的相应章节和参考文献［1］、［11］和［15］。

简单来说，采用了固定pH梯度的双向电泳技术的第一向（IEF）是依据Görg等[13]；于2000年[15]和2004年[11]更新的方法，采用独立的，宽3mm、最长至24cm的，附着在GelBond PAGfilm支持膜上的IPG胶条（实验室自制或市售Immobiline干胶条）进行的。样品可以通过杯上样或水化上样的方法进入胶条。IEF完成后，IPG胶条经含有尿素、甘油、二硫苏糖醇（DTT）和碘乙酰胺的SDS缓冲液平衡后转移至水平或垂直的SDS胶上进行第二向。利用半自动仪器可以在相当程度上简化双向电泳。例如，使用IPGphor进行第一向，并使用多个SDS-PAGE仪器可平行分离最多20个不同样品。电泳完成后，经分离的蛋白质通过染色的方法显示出来。染色方法包括使用硝酸银或有机染料染色，使用放射自显影（或磷光成像）显示同位素标记的样品，或最好利用荧光分子染料标记或显色[11]。

13.2　材　　料

13.2.1　仪器

下列仪器均来自GE Healthcare/Amersham Biosciences：

（1）等电聚焦仪（Multiphor II）。

（2）IPG干胶条（IPG DryStrip）泡胀盘。

（3）IPG干胶条（IPG DryStrip）试剂盒。

（4）IPGphor。

（5）IPGphor持胶槽。

（6）IPGphor杯上样持胶槽。

（7）多重垂直SDS电泳仪（Ettan DALT）。

（8）SDS灌胶模具。

（9）压模架。

（10）玻璃盘。

（11）循环水控温装置（Multitemp III）。

（12）电源（Multidrive XL）。

（13）实验室用摇床.

13.2.2　溶液

（1）尿素裂解溶液：9.5mol/L尿素，2%（*m/V*）CHAPS，2%（*V/V*）Pharmalyte pH3～10，1%（*m/V*）DTT。

a. 配制50ml裂解溶液：将30.0g尿素（Merck，Darmstadt，Germany）溶解于去

离子水中，定容至 50ml。

b. 加入 0.5g 含有 Serdolite MB-1 的离子交换树脂（Serva，Heidelberg，Germany）；摇动 10min，过滤。

c. 将 1.0g CHAPS（GE Healthcare，Freiburg，Germany），0.5g DTT（Sigma-Aldrich，Taufkirchen，Germany），1.0ml pH 3.0～10 的 Pharmalyte（GE Healthcare）和 50mg Pefabloc 蛋白酶抑制剂（Merck）（用前现加）加入至 48ml 前面配制的尿素溶液中（见注释 1 和注释 2）。

d. 为溶解更加疏水的蛋白质，应使用硫脲/尿素裂解溶液［2mol/L 硫脲（Sigma-Aldrich），5～7mol/L 尿素，2%～4%（*m/V*）CHAPS 和（或）硫代甜菜碱去垢剂（如 SB 3～10），1% DTT，2%（*V/V*）载体两性电解质］配合 IPG 胶条水化液。水化液由尿素/硫脲混合物［6mol/L 尿素、2mol/L 硫脲、1%（*m/V*）CHAPS、15mmol/L DTT、0.5%（*V/V*）Pharmalyte，pH 3.0～10.0）组成[18]。

（2）IPG 干胶条水化液：8mol/L 尿素、0.5%（*m/V*）CHAPS、15mmol/L DTT、0.5%（*V/V*）Pharmalyte，pH 3.0～10.0。

a. 配制 50ml 水化液：在去离子水中溶解 25.0g 尿素（Merck）并定容至 50ml。

b. 加入 0.5g Serdolite MB-1 离子交换树脂（Serva、Heidelberg、Germany），摇动 10min，过滤。

c. 在 48ml 该溶液中加入 0.25g CHAPS（GE Healthcare），0.25ml Pharmalyte，pH 3.0～10.0，40%（*m/V*）GE Healthcare 和 100mg DTT（Sigma-Aldrich）并用去离子水定容至 50ml。

（3）IPG 胶条平衡液：6mol/L 尿素，30%（*m/V*）甘油，2%（*m/V*）SDS 溶解至 0.05mol/L pH 8.6 Tris-HCl 缓冲液中。

a. 配制 500ml 平衡液：将 180g 尿素（Merck），150g 甘油（Merck），10g SDS（Serva），16.7ml SDS 凝胶缓冲液［见（4）］和少许溴酚蓝（Serva）。

b. 将上述试剂用去离子水溶解并定容至 500ml。平衡液可在室温保存两周。

（4）SDS 凝胶缓冲液：1.5mol/L pH 8.6 Tris-HCl 和 0.4%（*m/V*）SDS。

a. 配制 500ml 缓冲液：将 90.85g Trizma 碱（Sigma-Aldrich）和 2.0g SDS（Serva）溶解于约 400ml 去离子水中。

b. 用 4mol/L HCl（Merck）调整 pH 至 8.6 并用去离子水定容至 500ml。

c. 加入 50mg 叠氮化钠（Merck）并过滤。缓冲液可在 4℃保存 2 周。

（5）电极缓冲液储液：配制 5L 电极缓冲液储液：溶解 58.0gTrizma 碱（Sigma-Aldrich），299.6g 甘氨酸（Sigma-Aldrich）和 19.9g SDS（Serva），用去离子水定容至 5.0L。

（6）丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液（30.8% T，2.6% C）：30%（*m/V*）丙烯酰胺和 0.8%（*m/V*）甲叉双丙烯酰胺，由去离子水配制。

a. 配制 500ml 溶液：溶解 150.0g 丙烯酰胺（GE Healthcare）和 4.0g 甲叉双丙烯酰胺（GE Healthcare）于去离子水中并定容至 500ml。

b. 加入 1～2g Serdolit MB-1（Serva），摇动 10min，过滤。

c. 溶液可在冰箱中贮存2周。

(7) 过硫酸铵溶液：10%（m/V）过硫酸铵溶解于去离子水中。配制10ml溶液：将1.0g过硫酸铵（GE Healthcare）溶解于10ml去离子水中。溶液应在使用前新鲜配制。

(8) 指示液：50%（V/V）甘油和0.01%（m/V）溴酚蓝溶解于去离子水中。配制500ml指示液：将250ml甘油（100%；Merck）和250ml去离子水混合后加入50mg溴酚蓝（Serva），摇动数分钟。

(9) 覆盖液：饱和2-丁醇。配制30ml覆盖液：将20ml SDS凝胶缓冲液和30ml 2-丁醇（Merck）混合，等待数分钟至两相分层，用滴管吸去丁醇层。

(10) 琼脂糖溶液：在电极缓冲液中加入0.5%（m/V）的琼脂糖（GE Healthcare），在沸水浴中熔化或用微波炉熔化。

13.3 方　　法

13.3.1 第一向：在IPG胶条中进行等电聚焦（IPG-IEF）

采用IPG（IPG-Dalt）的双向电泳技术的第一向，等电聚焦（IEF）是采用独立的，3mm宽的，附着在GelBond PAG支持膜上的IPG胶条进行的。目前已有7cm、11cm、18cm和（或）24cm长的几乎所有需要的pH范围的预制Immobiline干胶条。例如，宽pH范围的IPG 3～10和IPG 3～11，中等pH范围的IPG 4～7或IPG 6～9，窄pH范围的IPG 4～5或IPG 4.5～5.5（如GE Healthcare，Bio-Rad，Sigma-Aldrich，Serva）。或者也可使用实验室自制IPG干胶条。关于IPG灌制的细节，有兴趣的读者可以参考之前发表的方法[21]。

在进行IEF之前，需要水化IPG干胶条，然后再将胶条置于水平等电聚焦仪的冷却盘上[13,22]。最近，一种叫做IPGphor的整体系统的使用简化并加速了IPG-IEF。这种仪器的特点有：在持胶槽中水化单独的IPG干胶条或在水化同时上样，可以选择杯上样，使用高电压（8000V）进行后续IEF，在IPG干胶条放入陶瓷持胶槽后无需再对其进行操作。

当使用pH大于9的IPG胶条时，DTT的消耗会导致碱性端的水平漂移。为消除漂移，在胶条的水化液中，可用二硫代羟乙基（HED）（DeStreak™，GE Healthcare）代替DTT等还原剂来保持半胱氨酸中二硫键的稳定。除了能去除漂移外，使用HED使点更清晰并提高重复性[23]。而且，使用IPGphor，可使如核糖体和核蛋白等等电点大于10的极端碱性蛋白的等电聚焦得到大大的简化[15-17]。

1. IPG胶条的水化和上样

在进行IEF之前，IPG干胶条必须在水化盒或水化盘中水化至其原始厚度0.5mm。IPG干胶条可用溶解有样品的水化液进行水化（水化上样）[24]或用不含样品的水化液进行水化，然后再用杯上样的方法上样。虽然水化上样更方便，但在样品含有高分子质量（<100kDa），极端碱性和（或）极端疏水的蛋白质时不推荐使用这种方法。这是因为

这些蛋白质不易进入胶内。其原因可能是蛋白质和水化盘壁之间的疏水互作或凝胶基质孔径的限制作用。如果样品体积显著地超出 IPG 胶条水化后预计达到的体积，后一种现象就特别明显。高分子质量蛋白质更可能留在多出的水化液中而不是进入 IEF 胶中。交叉污染也是一个问题，因此水化盘在不同次实验之间必须彻底清洗。总之，水化上样不如杯上样可靠，特别是在定量实验中。

在杯上样中，IPG 干胶条仍旧用水化液水化。IPG 胶条水化后，将溶解在裂解缓冲液中的样品（20～100μl）加入在 IPG 胶条表面上的一次性塑料或硅胶杯中（见注释 3)。将样品加在 pH 极端位置时效果最好，也就是靠近阴极或阳极。大多数情况下在阳极附近上样比在阴极附近上样更好。当使用碱性 pH 梯度，如 IPG 6～12 或 9～12，所有样品都必须从阳极上样[15-17]。

单根 IPG 胶条的蛋白质上样量由几个因素决定。按照经验：分离距离越长（也就是胶条越长），pH 梯度范围越窄，蛋白质检测方法越不灵敏，则所需蛋白质越多。20cm×20cm 的分析用（银染）双向电泳凝胶的推荐上样量为 50～100μg，微量制备凝胶的推荐上样量多至 1mg（或更多）。当使用非常窄的 pH 范围的 IPG 胶条时，我们强烈建议仅使用预分离后的样品[25]。

1）用水化盘水化 IPG 干胶条

（1）如果在水化的同时上样[24]，则直接将细胞裂解产物或组织样品（5～10mg 蛋白质/ml）溶解至适量的 IPG 干胶条水化液中。水化 180mm 长、3mm 宽的胶条时，可吸取 350μl 上述溶液置于 IPG 干胶条水化盘中的凹槽中（图 13-2)。如 IPG 胶条更长或更短，水化液体积需要进行相应换算（如 240mm 长的 IPG 干胶条用 450μl)。

（2）从 IPG 干胶条表面撕去保护膜，将 IPG 胶条胶面朝下放入凹槽中，同时避免产生气泡。然后用 IPG 干胶条覆盖油覆盖 IPG 胶条（避免水化时胶条变干）。覆盖前胶条应能够活动且没有粘在水化盘上。覆盖后在约 20℃条件下过夜水化 IPG 胶条。温度过高（＞37℃）有氨基甲酰化的危险，而温度过低（＜15℃）会导致尿素在 IPG 胶中结晶。

（3）如果使用杯上样，则将 IPG 干胶条用没有样品的水化液在水化盘中仍旧按上述第二步的方法过夜水化。

2）用 IPGphor 持胶槽水化胶条并同时上样

（1）用样品溶解缓冲液（也就是尿素/硫脲裂解缓冲液）溶解蛋白质并用 IPG 干胶条水化缓冲液稀释提取液。

（2）将所需数量的 IPGphor 持胶槽（图 13-2）置于 IPGphor 的冷却盘/电极区域。

（3）吸取 350μl 溶有样品的水化液（使用 180mm 长的 IPG 胶条时）放入持胶槽底部。

（4）由 IPG 胶条上去除保护膜，然后缓慢地将 IPG 胶条（胶面朝下）放入水化液中。避免产生气泡。胶条应仍然能够活动且没有粘在水化盘上。用 1～2ml IPG 干胶条覆盖油覆盖 IPG 胶条然后盖上塑料盖。按压在盖子下的支撑块以确保 IPG 胶条在水化时与电极保持良好接触。水化时加低电压（30～50V）以使高分子质量蛋白质更好地进入胶内[15,28]。

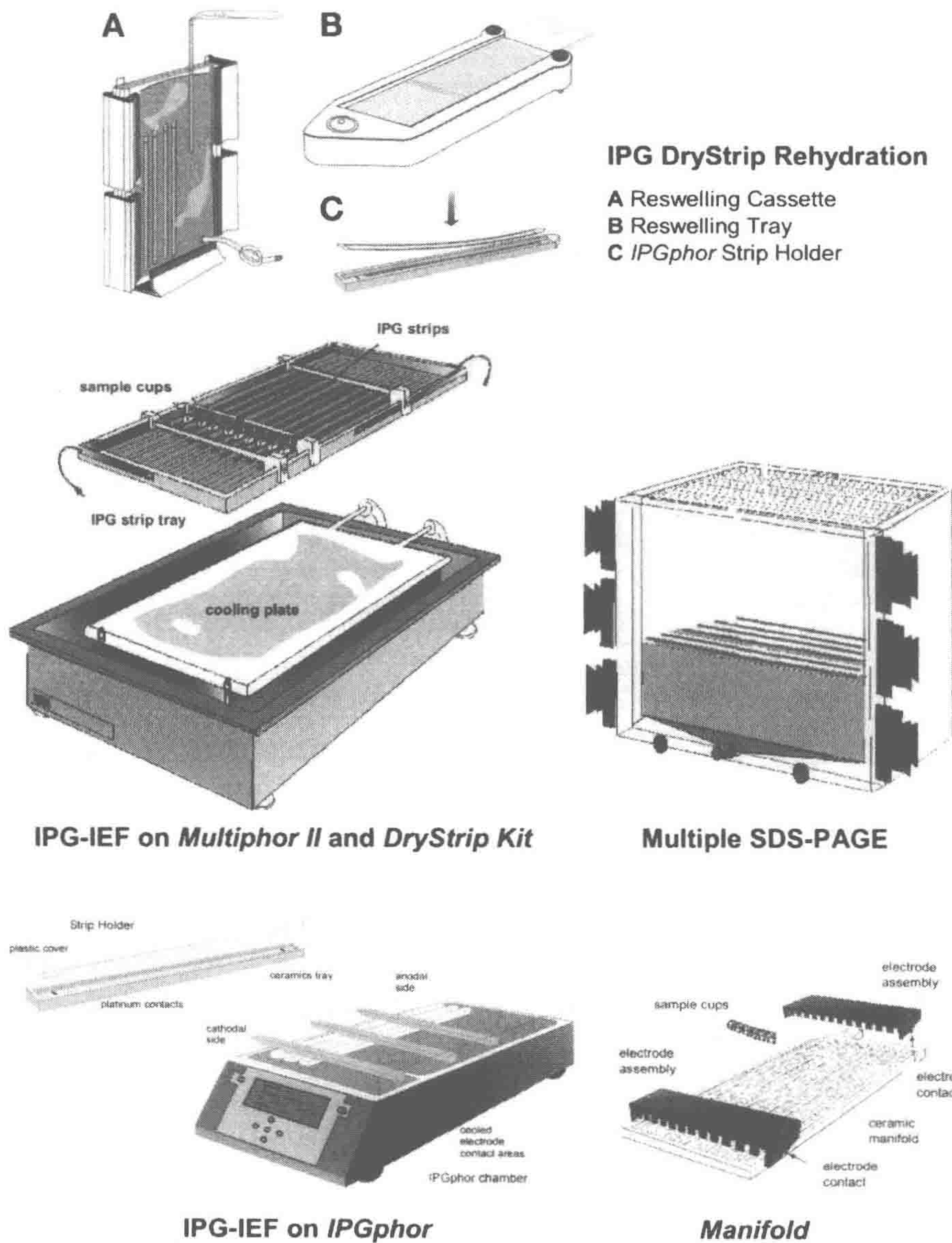


图 13-2　基于 Görg 等[13,15]的方法的使用 IPG 进行 2-DE（IPG-Dalt）的步骤（依据参考文献［33］的许可）

IPG DryStrip 水化。A. 水化盒；B. 水化盘；C. IPGphor 持胶槽。IPG 胶条；上样杯；IPG 胶条盘；冷却盘；使用 Multiphor Ⅱ 和 DryStrip 试剂盒进行 IPG-IEF；多重 SDS-PAGE 持胶槽；塑料盖；陶瓷槽；铂电极；阳极端；阴极端；经冷却的电极区；IPGphor 箱；集合电极；上样杯；电极接点；陶瓷盘；用 IPGphor 进行 IPG-IEF；盘

2. 在平板仪器上进行 IPG—IEF（Multiphor II Unit）

满足下列条件时，水化后的 IPG 胶条可以直接放在 IEF 仪器的冷却板上：①如果运行时间不超过 12h（经常发生在宽的或中等 pH 范围 IPG，如 IPG3～10 或 4～7）。②如果 pH 梯度不超过 pH10.0。③如果只用杯上样的方法加很小体积的样品（20μl）1[3,22]。使用 Immobiline 干胶条试剂盒中的上样杯更方便进行大体积的样品上样（直至 100μl）。当用干胶条试剂盒进行 IEF 时，IPG 胶条可以用硅树脂油或干胶条覆盖油覆盖。当样品为极端碱性（pH>10.0）蛋白质或用窄 pH 梯度（pH 范围≤1 单位）进行微量制备电泳时必须用覆盖油等覆盖；而当 pH 范围较宽且 pH 梯度不超过 pH10.0（如 IPG 4～7 或 3～10）时，使用干胶条试剂盒时可不加覆盖油。

（1）将冷却盘放入 Multiphor II 电泳仪中。吸取 3～4ml 煤油或 IPG 干胶条覆盖油加在冷却盘上，然后将 Immobiline 干胶条盘放在冷却盘上（图 13-2）。在胶条盘和冷却盘之间避免产生气泡。

（2）将胶条盘上的电极连至 Multiphor II 电泳仪上。

（3）将 10ml 左右的 IPG 干胶条覆盖油或硅树脂油注入胶条盘中，将波纹状的 Immobiline 胶条标尺放在胶条盘中的覆盖油的顶端。

（4）IPG 胶条水化后（见 13.3.1 节 1.1），用干净的镊子从水化盘中取出水化好的 IPG 胶条。用去离子水冲洗胶条，然后将胶条放在两层湿润的滤纸之间，用滤纸吸胶条上多余的覆盖油几秒。这样能够防止 IEF 过程中尿素在胶表面结晶。转移水化后的 IPG 胶条（胶面朝上且酸性端对准阳极）放入槽中并靠近标尺。排列 IPG 胶条并保证对着阳极的胶条边缘排列整齐。

（5）切取两条 IEF 电极条（GE Healthcare）或由厚 2mm 的滤纸（如 MN440，Macherey & Nagel，Germany）制成的滤纸条，其长度为所有 IPG 胶条在胶条盘中排列的相应宽度。用去离子水浸泡电极条，再用滤纸吸走多余液体，然后将湿润的 IEF 电极条放在排列整齐的胶条的阴极和阳极附近。

（6）将电极放在 IEF 电极条上并轻轻向下按压电极。

（7）如果样品已经在水化时进入胶条，则用约 80ml 干胶条覆盖油覆盖胶条，然后转至第 12 步。如果用杯上样方法，则继续第 8 步。

（8）将上样杯放入上样杯槽中，但要避免接触胶条表面。而且，确保上样杯与阳极（或阴极，如果使用阴极上样）之间有几毫米的距离。

（9）将上样杯移动至合适位置，每个胶条上一个上样杯，然后轻轻向下压上样杯。上样杯要和胶条紧密接触但不能损坏胶条表面。

（10）放好上样杯之后，向胶条盘中注入约 80ml 的干胶条覆盖油以完全覆盖 IPG 胶条。如果覆盖油漏入上样杯，吸出覆盖油，重新调整上样杯，再次检查是否漏液。在每个上样杯中加入几滴干胶条覆盖油。如果使用 pH 为 3～10 的宽 pH 梯度进行 IEF，加覆盖油这一步可以省略。

（11）吸取样品并加入覆盖油下的上样杯底部。再次检查是否漏液。

（12）关闭等电聚焦箱的盖子，根据表 13-1 中的参数开始电泳。为使样品更好地进

入胶内，最初几小时的电压应被限制在 150V、300V、600V。然后用最大电压 3500V 电泳至稳态（见注释 4）。电流限制在 0.05mA/IPG 胶条。最佳聚焦温度是 20℃[26]。

（13）当 IEF 结束后，从胶条盘中取出电极、上样杯槽和 IEF 电极条。用干净的镊子从胶条盘中取出 IPG 胶条。如果 IPG 胶条不被立刻用来进行第二向电泳和（或）用来进一步研究，可将它们夹在两层塑料膜之间贮存在−70℃，可贮存数月。

表 13-1 用 Multiphor Ⅱ IEF 电泳槽进行等电聚焦（IEF）的工作条件[a]

IPG 胶条长度	180mm
温度	20℃
最大电流	每根 IPG 胶条 0.05mA
最大功率	每根 IPG 胶条 0.2 W
最大电压	3500V
1. 分析用 IEF	
起始 IEF：	
杯上样（20～50μl）	
150V，1～3h[b]	
300V，1～3h[b]	
600V，1h	
水化上样（350μl）	
150V，1～3h[b]	
300V，1～3h[b]	
在 3500V 稳态下进行 IEF	
1～1.5 pH 单位	
如 IPG 5～6	24h
如 IPG 4～5.5	20h
3 pH 单位	
IPG 4～7	12h
IPG 6～9	12h
4 pH 单位	
IPG 4～8	10h
IPG 6～10	10h
5～6 pH 单位	
IPG 4～9	8h
IPG 6～12	8h
7～8 pH 单位	
IPG 3～10	6h
IPG 3～11	6h
8～9 pH 单位	
IPG 3～12	6h
IPG 4～12NL	8h
2. 更长分离距离（240mm）	
在 3500V 稳态下进行 IEF	
IPG 3～12	8h
IPG 4～12NL	12h
IPG 5～6	40h

续表

3. 微量制备 IEF
起始 IEF 杯上样（100μl） 50V，12～16h 300V，1h 水化上样（350μl） 50V，12～16h 300V，1h 在 3500V 稳态下进行 IEF： 聚焦时间比分析用 IEF 多大约 50％

a：步骤来自于 Görg 等[15]。

b：起始 IEF（样品进入胶内）所需的时间受样品盐浓度的影响。盐越多，时间越长。

3. 使用 IPGphor 电泳仪进行 IPG-IEF

使用一种叫做 IPGphor（GE Healthcare，最近 Bio-Rad 也开发出一套类似的系统）的整体系统可使双向电泳中的 IPG-IEF 简化[27]。IPGphor 包括一个可精确控温（在 19.5～20.5℃）的 Peltier 元件和一个可编程的电源。这个仪器的核心部分是不同长度的（7cm、11cm、13cm、18cm 或 24cm）氧化铝陶瓷制的细槽，被称为持胶槽。IPG 胶条可在持胶槽中水化并同时上样，然后进行 IEF。当胶条被放入持胶槽后，后续步骤无需对胶条进行进一步操作（图 13-2）。IPGphor 是可编程的，而且最多可以存储 10 组不同程序。该仪器支持延迟启动，这使得使用者可以在下午在持胶槽中用含有样品的水化液水化胶条，然后晚上 IEF 自动启动并在第二天早上结束。

当在碱性 pH 范围内（＞pH10.0）进行蛋白质分离时，用杯上样的方法单独对不同的水化好的 IPG 胶条上样比用水化上样的方法上样得到的分离效果好得多。可以使用特殊杯上样（“通用”）IPGphor 持胶槽，或复合式杯上样持胶槽（“复合式”）进行样品的杯上样（图 13-2）。杯上样最多允许上 100μl 样品（见注释 3）。持胶槽平台能够调节温度并能将持胶槽与电源连接。除了操作简单外，IPGphor 的另一个优势是聚焦时间短。这是因为用 IPGphor 能在很高的电压下（最高 8000V）进行 IEF。

使用 IPGphor 进行 IEF 的典型工作条件见表 13-2 和表 13-3。正如前文指出的那样，为了使高分子质量的蛋白质更好地进入聚丙烯酰胺胶内，水化时应在胶条两端加低电压（30～50V），否则将给水化上样造成困难[15,28]。然后电压逐步升高至 8000V。如果 IPG 胶条的分离长度≤11cm，电压应限制在 5000V 内。为在分离含盐量高的样品或使用窄 pH 间隔分离样品时得到最佳效果，在电压升高至 8000V 之前可在电极和 IPG 胶条之间垫上湿润的滤纸片（尺寸：4mm×4mm）（见注释 4）。当 IEF 结束后，按 13.3.1 节 2. 第 13 步中的方法贮存 IPG 胶条。

表 13-2　IPGphor 工作条件（水化上样和杯上样）[a]

胶条长度	180mm
温度	20℃
最大电流	每根 IPG 胶条 0.05mA
最大电压	8000V
1. 分析用 IEF	
水化[b]	
30V，12～16h[b]	
起始 IEF	
200V，1h	
500V，1h	
1000V，1h	
在稳态下进行 IEF	
在 30min 内逐步由 1000V 升高至 8000V	
8000V 下稳态，根据所使用的不同 pH：	
1～1.5 pH 单位	
如 IPG 5～6	8h
如 IPG 4～5.5	8h
3 pH 单位	
IPG 4～7	4h
4 pH 单位	
IPG 4～8	4h
5～6 pH 单位	
IPG 4～9	4h
7 pH 单位	
IPG 3～10L	3h
IPG 3～10NL	3h
8～9 pH 单位	
IPG 3～12	3h
IPG 4～12	3h
2. 微量制备 IEF	
水化[b]	
30V，12～16h	
在稳态下进行 IEF：	
聚焦时间为分析用 IEF 加大约 50%	

a：步骤来自于 Görg 等[15]。

b：如果使用杯上样，省略低电压水化步骤。

表 13-3　极端碱性固定 pH 梯度（IPG）时 IPGphor 工作条件（杯上样）

胶条长度	180mm
温度	20℃
最大电流	每根 IPG 胶条 0.07mA
最大电压	8000V
IPG 6～12、9～12、10～12	

续表

上样	阳极
起始 IEF	150V，1h
	300V，1h
	600V，1h
在稳态下进行 IEF	
在 30min 内逐步由 600V 升高至 8000V	
8000V 下稳态	
总伏小时：	32000Vh

1）水化上样 IEF

（1）将所需数量的持胶槽放在冷却盘或 IPGphor 的电极区（图 13-2）上。吸取适量（如 180mm 长 IPG 胶条吸取 350μl）的含有样品的 IPG 干胶条水化液注入持胶槽中，将 IPG 胶条胶面朝下放入水化液中，然后用 IPG 干胶条覆盖油覆盖。具体方法见 13.3.1 节 1.2）。

（2）设置 IPGphor（所需的水化时间、伏小时、电压梯度）。

（3）IPG 胶条水化后（至少需要 6h，通常过夜），按表 13-2 所列参数开始 IEF。

（4）IEF 完成后，将那些不立刻进行第二向电泳的 IPG 胶条夹在两层塑料膜之间贮存于−70℃。

2）杯上样 IEF

（1）在水化盘中用不含样品的水化液水化 IPG 干胶条。IPG 胶条水化后，用干净的镊子将水化好的 IPG 胶条从水化盘或水化盒中取出。用去离子水冲洗胶条，然后将胶条放在两层湿润的滤纸之间，用滤纸吸胶条上多余的覆盖油几秒。这样能够防止 IEF 过程中尿素在胶表面结晶。见 13.3.1 节 2.。

（2）将所需数量的杯上样持胶槽放在冷却盘或 IPGphor 的电极区上，确保持胶槽的尖端（阳极）与电极区的阳极区相连。可以使用复合式持胶槽代替独立持胶槽。

（3）将水化好的 IPG 胶条放入杯上样持胶槽（或复合式持胶槽）中，胶面朝上且胶条尖端（酸性端）对准阳极。确保 IPG 胶条的阴极距离槽的末端约 1.5cm 且通过电极丝与电极连通。

（4）用去离子水润湿两张电极滤纸垫片（尺寸：4mm×10mm），用滤纸吸掉过多的去离子水，然后将润湿的电极滤纸垫片放在阳极和阴极电极与 IPG 胶条之间 IPG 胶条的表面上。如果必要（如当样品含盐量高），数小时后可以更换新的滤纸垫片。

（5）将活动电极放在电极滤纸垫片上。夹紧电极使其紧压电极滤纸垫片。

（6）将可移动的上样杯放在阳极或阴极附近，然后轻轻将上样杯压在 IPG 胶条表面上。上样杯应与 IPG 胶条紧密接触但不能损伤胶条表面。

（7）为确保上样杯不漏液，向杯中加入 100μlIPG 覆盖油。如发现漏液，除去覆盖油并用绵纸吸净覆盖油，然后重新放置上样杯。再次检查是否漏液。上样前吸出覆盖油。

（8）每根胶条用 2～4ml IPG 胶条覆盖油覆盖（建议不要使用硅树脂油或煤油替代

IPG 胶条覆盖油)。万一覆盖油漏入上样杯，重新放置上样杯并用绵纸吸净杯中的覆盖油。再次检查是否漏液，然后吸取样品（20～100μl）加入上样杯。

（9）设置仪器（所需伏小时、电压梯度、温度等）并按表 13-2 和表 13-3 中推荐的参数进行 IEF。省去表 13-2 中为水化上样推荐的低电压水化步骤。

（10）IEF 完成后，继续进行平衡或第二向 IEF（SDS-PAGE）（见 13.3.3 节），或将 IPG 胶条夹在两层塑料膜之间贮存于－70℃，可贮存数月。

13.3.2　IPG 胶条平衡

在进行第二向分离（SDS-PAGE）之前，平衡 IPG 胶条使胶条中分离的蛋白质与 SDS 充分作用十分重要。由于与载体两性电解质凝胶相比，聚焦后的蛋白质与 IPG 胶条的结合更加紧密，因此需要相对长的平衡时间（10～15min）以及尿素和甘油来改善蛋白质在第一向和第二向之间的转移效果。其中尿素和甘油可以减轻电渗作用的影响。目前最常用的步骤是将 IPG 胶条在一种最初由 Görg 等[13]提出的缓冲液［50mmol/L Tris-HCl（pH 8.8）、2%（*m/V*）SDS、1%（*m/V*）DTT、6mol/L 尿素、30%（*m/V*）甘油；表 13-4 中平衡 10～15min。然后再将胶条在把上述缓冲液中的 DTT 换成 4%（*m/V*）碘乙酰胺后形成的缓冲液中进一步平衡 10～15min。后面的步骤是用来烷基化游离的 DTT，否则 DTT 会在第二向 SDS-PAGE 胶中迁移，从而导致点拖尾现象。该现象在银染之后就会被观察到。更重要的是，碘乙酰胺会烷基化巯基并阻止它们的氧化还原作用。我们强烈推荐使用这种还原/烷基化两步程序，这是因为它能够相当程度上简化后续质谱鉴定的样品制备工作（胶内消化蛋白质）。平衡后，IPG 胶条被放在第二向水平或垂直 SDS-PAGE 胶的表面。

（1）溶解 100mg DTT（Sigma-Aldrich）至 10ml 平衡液中以配制平衡液Ⅰ。

a. 为每根胶条准备 10ml。

b. 将每根聚焦后的胶条放入一个试管（250mm 长，内径 20mm）中，在每个试管中加入 10ml 平衡液Ⅰ。

c. 试管用 Parafilm 密封后在摇床上摇动 15min，然后倒出平衡液。也可使用较短的平衡时间（10min），不过这样做的风险是在样品进入 SDS-PAGE 胶时一些蛋白质可能不会从 IPG 胶条中出来。如果这样，应当在把 IPG 胶条从 SDS 胶上取下后将 IPG 胶条染色，以检查是否所有的蛋白质离开了 IPG 胶条。

（2）溶解 0.4g 碘乙酰胺（Sigma-Aldrich）至 10ml 平衡液中以配制平衡液Ⅱ。

a. 为每根 IPG 胶条准备 10ml。

b. 向每根胶条加入 10ml 平衡液Ⅱ和 50μl 作为 SDS-PAGE 指示剂的溴酚蓝（Serva）溶液，再次轻轻摇动平衡 15min。

（3）倒出平衡液Ⅱ，进行 SDS-PAGE（见 13.3.3 节）。如果用水平电泳槽（如 Multiphor Ⅱ）进行 SDS-PAGE，用去离子水短暂地冲洗 IPG 胶条，然后将胶条放在一张滤纸的一边，等待几分钟以吸净多余的平衡液。如果用垂直电泳槽（如 Ettan Dalt）进行 SDS-PAGE，用电极缓冲液短暂地冲洗 IPG 胶条。

表 13-4　IPG 胶条平衡步骤

试剂	作用	
50mmol/L Tris-HCl，pH 8.8		
+2% SDS		
+6mol/L 尿素	改善蛋白质从 IPG 胶条转移至 SDS 胶的效果	
+30% 甘油		
+1% DTT		
+4% 碘乙酰胺	消除点拖纹，烷基化 SH 基	
	DTT	碘乙酰胺
1. 15min（10min）	+	−
2. 15min（10min）	−	+

13.3.3　第二向：多重垂直 SDS-PAGE

SDS-PAGE 可以在水平或垂直系统上进行[29]。水平设备[30]适用于预制胶（如 ExcelGel SDS；Amersham Biosciences/GE Healthcare）。而垂直系统则应用于多块胶平行进行的电泳中，尤其是大规模的蛋白质组分析中。这种分析通常需要同时进行数批第二向 SDS-PAGE 电泳以达到更高的通量和最好的重复性[31]。

1. 灌制 SDS 胶

（1）灌胶胶板（200mm×250mm）由两块书本形状的 3mm 厚的玻璃板组成。两块玻璃板用一根铰链条连接，玻璃板之间有两条 1mm 厚的边条。将 14 块胶板垂直堆入 Ettan Dalt Ⅱ的灌胶模具中。堆叠时铰链条朝右，胶板之间用塑料分隔片（如 0.05mm 厚聚酯片）分隔。

（2）将灌胶模具的前板放好，旋上螺帽（用手拧紧）（图 13-2）。

（3）用环架将一个漏斗支撑在灌胶模具顶端上方约 30cm 处，用一根聚乙烯管（内径 5mm）与之连接。管的另一头与灌胶模具一边的侧室上的金属接口相连。

（4）向侧室中灌入 100ml 指示剂。

（5）在即将灌胶之前，在凝胶溶液中加入 TEMED 和过硫酸氨溶液（表 13-5）。灌胶时，将凝胶溶液（830ml）注入漏斗。管中避免产生气泡。不要用丙烯酰胺溶液将胶板灌满。这是由于用热琼脂糖将 IPG 胶条固定在 SDS 胶顶端时需要一定的空间（约 10mm）。

（6）当溶液注入之后，将管从侧室接口上取下。此时侧室中指示剂的水平面会下降。

（7）小心地向每块胶的顶端加入约 1ml 覆盖液以使胶面平整光滑。

（8）让凝胶在约 20℃聚合至少 3h，为获得更好的重复性，最好过夜聚合。

（9）胶聚合后，将灌胶模具的前板取下，小心地从模具中取出胶板。可用刀片将胶板分开。将胶板之间的分隔片取下。

（10）用水清洗胶板以除去胶板外表面的丙烯酰胺，然后将多余液体从胶上端排出。

由于电泳一次只能用掉 12 块胶板，应丢弃不理想的胶板，尤其是厚度不均匀的胶板。通常是外侧的胶板。

（11）如果聚合好的凝胶不被立即使用，可将它们用塑料包好贮存在冰箱中（4℃）。最长可贮存 2 天。

表 13-5　灌制垂直 SDS 胶（7.5% T、10% T、12.5% T 或 15% T）的配方

项目	7.5% T、2.6% C	10% T、2.6% C	12.5% T、2.6% C	15% T、2.6% C
丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺（30.8% T，2.6% C）	244ml	325ml	406ml	487ml
凝胶缓冲液	250ml	250ml	250ml	250ml
甘油（100%）	50.0g	50.0g	50.0g	50.0g
去离子水	461ml	380ml	299ml	218ml
TEMED（100%）	50μl	50μl	50μl	50μl
过硫酸铵（10%）	7.0ml	7.0ml	7.0ml	7.0ml
总体积	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

2. 使用 Ettan Dalt Ⅱ垂直电泳槽进行多重 SDS-PAGE

（1）向 Ettan Dalt Ⅱ电泳槽下槽中加入 1875ml 电极缓冲液储液和 5625ml 去离子水。混合并打开冷却器（25℃）。

（2）将 DALT 胶板（内有 SDS 凝胶）垂直放置在胶板架上以便放上 IPG 胶条。

（3）用电极缓冲液（用水 1∶1 稀释）短暂冲洗平衡好的 IPG 胶条，将胶条放在 DALT 胶板顶端。

a. 用薄刮刀或尺子推 IPG 胶条背后支持膜，使胶条进入两层玻璃板之间的空隙中。

b. 加入 2ml 热（75℃）琼脂糖溶液，继续将胶条向下推向 SDS 胶表面直到两者紧密接触。IPG 胶条和 SDS 胶表面之间避免产生气泡。

c. 如需在电泳同时加入分子质量标准蛋白质，可用 5μl 溶有 SDS 标准蛋白质的电极缓冲液浸泡一张滤纸片（2～4mm^2）。弄干滤纸片后将其放在 IPG 胶条的左侧或右侧。

d. 干燥后的溶有分子质量标准蛋白质的滤纸片可放在微量离心管中贮存于－70℃。

（4）在将胶板放入电泳设备（见第 5 步）之前让琼脂糖凝固至少 5min。对剩余 IPG 胶条重复上述步骤。虽然将胶条埋入琼脂糖并不是必须的，但这样做能保证 IPG 胶条和 SDS 凝胶顶端结合更紧密。

（5）将胶板浸入电极缓冲液使其外侧湿润以便放入电泳槽时更容易。将胶板插入电泳槽中。如有必要，在电泳槽中空着的狭槽中放入空的胶板。将上槽穿过胶板放好，并在其中加入 2.5L 电极缓冲液（1250ml 储液＋1250ml 去离子水）。

（6）盖上电泳槽的安全盖，并开始 SDS-PAGE。开始时以每块胶 5mA（设置最高

100V）跑大约 2h。然后以每块胶 15mA（设置最高 200V）过夜跑大约 16h，或更高的电流以便跑得更快（每块胶 30mA 大约 8h）。

（7）当溴酚蓝踪迹迁移出凝胶下端后终止电泳。

（8）电泳结束后，小心地用塑料刮刀打开胶板。用刮刀将琼脂糖从聚丙烯酰胺凝胶上去除。小心地从玻璃板上剥下凝胶，拎着它的下缘将其放入装有固定液或染色液的盒子里。

13.4 注　　释

（1）裂解缓冲液和 IPG 胶条水化液应当现配现用。或者分装成小份（1ml）贮存于－70℃。一旦裂解缓冲液和水化液解冻，不要再次冷冻它们。

（2）绝不要将尿素溶液加热到超过 37℃，以避免蛋白质氨基甲酰化。在添加其他药品前将尿素溶液用离子交换剂去除离子十分重要。这是因为在水溶液中尿素会转化为氰酸铵并达到平衡状态。氰酸铵可以和蛋白质侧链上的 NH_3^+ 反应从而在双向凝胶上引起电荷现象（出现额外的蛋白点）。另外，在裂解缓冲液和水化液中一定要有载体两性电解质以除去氰酸盐。

（3）如果要用杯上样的方法向 IPG 胶条加入多于 100μl 的样品，先加入 100μl，然后以低电压（最大 300V）进行 IEF，直到样品转移出上样杯。接着再加入另外 100μl，如此反复直到样品全部加入。

（4）理论上讲，从 IPG-IEF 开始到 IEF 完成这段时间里不需要进行进一步的操作。然而在实践中，如果在样品进入 IPG 胶条后用新的电极滤纸垫片更换电极和 IPG 胶条之间的电极滤纸垫片可以得到更好的结果。当样品含盐或蛋白质较多时或使用极端碱性（如 IPG 6～12 或 IPG 9～12）IPG 时，这一点尤其重要。因为盐分已经快速地沿着凝胶移动并被集中于电极滤纸垫片中。遇到这些情况时，应每 2h 更换一次滤纸垫片，如果用极端碱性的窄范围 IPG，如 IPG 10～12，进行 IEF 时，应当每小时更换一次。

（5）当使用超过 pH 10.0 的碱性 IPG 梯度（如 IPG 6～12 或 IPG 9～12）进行第一向时，经常会在双向蛋白质图谱的碱性端观察到水平漂移现象。用二硫化物如二硫代羟乙基[23]代替水化液中的 DTT 以及使用高电压（8000V）以缩短电泳时间[15-17]可能会解决此问题。

参 考 文 献

1. Damerval, C., Zivy, M., Granier, F., and de Vienne, D. (1989) Two-dimensional electrophoresis in plant biology. *Adv. Electrophoresis* **2,** 263–340.
2. Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., et al. (1999) Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20**, 2013–2026.
3. Thiellement, H., Zivy, M., and Plomion, C. (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *J. Chromatogr. B*. **782,** 137–149.
4. Cánovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrin, J., Mock, H.-P., and Rossignol, M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* **4,** 285–298.

5. Bolwell, G. P., Slabas, A.R., and Whithelegge, J. P. (2004) Proteomics: empowering systems biology in plants. *Phytochemistry* **65,** 1665–1669.
6. Posch, A., van den Berg, B., Duranton, C., and Görg, A. (1994) Polymorphism of pepper (*Capsicum annuum* L.) seed proteins studied by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: methodical and genetic aspects. *Electrophoresis* **15,** 297–304.
7. Görg, A., Postel, W., Baumer, M., and Weiss, W. (1992) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, with immobilized pH gradients in the first dimension, of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed proteins: discrimination of cultivars with different malting grades. *Electrophoresis* **13,** 192–203.
8. Görg, A., Postel, W., and Weiss, W. (1992) Detection of polypeptides and amylase isoenzyme modifications related to malting quality of barley (*Hordeum vulgare* L.) by 2-D electrophoresis and isoelectric focusing with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **13,** 759–770.
9. Consoli, L., Lefèvre, A., Zivy, M., de Vienne, D., and Damerval, C (2002) QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Mol. Biol.* **48,** 575–581.
10. Weiss, W., Huber, G., Engel, K. H., Pethran A., Dunn, M. J., Gooley, A.A., and Görg, A. (1997) Identification and characterization of wheat grain albumin/globulin allergens. *Electrophoresis* **18,** 826–833.
11. Görg, A., Weiss, W., and Dunn, M. J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4,** 3665–3685.
12. O' Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250,** 4007–4021.
13. Görg, A., Postel, W., and Günther, S. (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **9,** 531–546.
14. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Csordas, A., Diaz, J. J. and Madjar, J. J. (1997) Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins. *Electrophoresis* **18,** 328–337.
15. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21,** 1037–1053.
16. Wildgruber, R., Reil, G., Drews, O., Parlar, H. and Görg, A. (2002) Web-based two-dimensional database of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using immobilized pH gradients from pH 6 to pH 12 and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **2,** 727–732.
17. Drews, O., Reil, G., Parlar, H., and Görg, A. (2004) Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics* **4,** 1293–1304.
18. Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. (1997) Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18,** 307–316
19. Hirano, H., Islam, N., and Kawasaki, H. (2004) Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry* **65,** 1487–1498.
20. Méchin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., and Damerval, C. (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteins in immobilized pH gradients. *Proteomics* **3,** 1299–1302.
21. Görg, A. and Weiss, W. (2000) 2D electrophoresis with immobilized pH gradients, in *Proteome Research: Two Dimensional Electrophoresis and Identification meth-*

ods (Rabilloud, T., ed.), Springer, New York, pp. 57–106.
22. Görg, A. and Weiss, W. (1999) Analytical IPG-Dalt. *Methods Mol. Biol.* **112,** 189–195.
23. Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R., and Bjellqvist, B. (2002) Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range IPG strips as first dimension. *Proteomics* **2,** 1630–1632.
24. Rabilloud, T., Valette, C., and Lawrence, J. J. (1994) Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH-gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **15,** 1552–1558.
25. Görg, A., Boguth, G., Köpf, A., Reil, G., Parlar, H., and Weiss, W. (2002) Sample prefractionation with Sephadex isoelectric focusing prior to narrow pH range two-dimensional gels. *Proteomics* **2,** 1652–1657.
26. Görg, A., Postel, W., Friedrich, C., Kuick, R., Strahler, J. R., and Hanash, S. M. (1991) Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns. *Electrophoresis* **12,** 653–658.
27. Islam, R., Ko, C., and Landers, T. (1998) A new approach to rapid immobilised pH gradient IEF for 2-D electrophoresis. *Science Tools* **3,** 14–15.
28. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., and Weiss, W. (1999) Recent developments in 2-D gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20,** 712–717.
29. Görg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., and Weiss, W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. *Electrophoresis* **16,** 1079–1086.
30. Görg, A. and Weiss, W. (1999) Horizontal SDS-PAGE for IPG-Dalt. *Methods Mol. Biol.* **112,** 235-244.
31. Anderson, N. L. and Anderson, N. G. (1978) Analytical techniques for cell fractions: multiple gradient-slab gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **85,** 341–354.
32. Posch, A., Weiss, W., Wheeler, C., Dunn, M. J., and Görg, A. (1995) Sequence analysis of wheat grain allergens separated by 2-D electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **16,** 1115–1119.
33. Westermeier, R. and Görg, A. (2005) in: *Protein Purification*, 3rd ed., (Janson, J. C., ed.), John Wiley & Sons, New York.

第14章　双向凝胶荧光染色与成像

François Chevalier，Valérie Rofidal 和 Michel Rossignol

摘要　在比较蛋白质组学中关于待测蛋白的数量、蛋白点的准确定量及其与质谱技术的兼容性研究过程中，双相凝胶电泳的染色是至关重要的一步。本章描述了多种与质谱技术兼容的用于凝胶染色的染料：考马斯亮蓝、硝酸银、Sypro Ruby、Deep Purple、5-十六碳酰基荧光素。

关键词　染色方案；双相电泳；硝酸银；胶状考马斯亮蓝；Sypro Ruby；Deep Purple；C16 荧光素

14.1　前　　言

通过电泳分离蛋白是蛋白质组学研究中常用的方法，因为其分辨率较高，有强大的进行凝胶对比的图像分析软件，并且与质谱技术的蛋白定性具有兼容性[1,2]。由于以上多方面原因，蛋白染色步骤显得尤为重要。

14.1.1　可供凝胶染色的染料

通常来说，考马斯亮蓝（CCB）是应用最广泛的蛋白质染料。然而，它在蛋白检测方面灵敏度较低（蛋白质的检测量为数十纳克）[3,4]。它和蛋白质是通过范德华力和亲水相互作用来结合的。这种非共价结合方式使得染料能与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）兼容[5]。长期以来，CCB一直被认为是大规模蛋白质分析中一种方便的染料。

另一种常用的蛋白质染料是硝酸银（SN），它具有较高的检测灵敏度（蛋白质的检测量最低可至1ng），但会干扰质谱技术进行的蛋白质分析。有两种银染方法被用来观察凝胶中的蛋白——酸性硝酸银和碱性铵银，两者在蛋白的结合特异性、灵敏度、成本和毒性方面有所不同[6,7]。银可以通过形成银盐的方式结合在蛋白质的谷氨酸和天冬氨酸残基的酸性基团上，或者形成复合体结合在组氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸或赖氨酸残基的亲核基团上[6]。由于涉及复杂的化学过程[6]，目前有许多改进的方案，这些方法可降低背景和增加灵敏度[8~10]。近年来，新的技术更关注如何改进银染方法和质谱技术的兼容性[11~16]。由于银离子对蛋白具有氧化作用和影响凝胶感化剂预处理[6]，造成对氨基酸不可逆修饰从而影响了肽质指纹图谱分析或其他的质谱分析。大多数的改进方法包括去掉交联剂和增敏剂如戊二醛、甲醛[5,11,14~16]，以及改进酶消化前的脱色方法[13]。本章描述了一种酸性方法，它具有较好的灵敏度、清晰的背景[15]，而且和质谱兼容。

在过去的几年中，一些荧光染料被用来凝胶染色，它们被证明具有较高的灵敏度而且兼容质谱鉴定。这些染料包括商业化的如 Sypros 系列染料，也包括以钌红为主要成分的染料[17~21]。Sypro Ruby (SR) 具有与 CCB 相似的一些特征[17,18]，它是一种发光的钌复合材料，可与蛋白非共价作用。由于染色过程中对氨基酸的修饰是可逆的，所以它与质谱可能会有较好的兼容性[17,19]。另外，尽管 SR 染色饱和度低，但它具有更宽的[22]线性范围；与 SN 相比，灵敏度更高，所以这种染料在大规模蛋白质组分析方面，应用性更强[23]。然而这种染料需要荧光扫描仪来扫描染色结果，从而增加了这种染色方法的成本，所以即使有钌复本，这一缺点也限制了其应用。

最近又有新的染料分子被发现。Deep Purple (DP) 起初被命名为"亮得快"，是一种灵敏度较高的荧光染料[25]，它是基于从真菌 *Epicoccum nigrum* 中提取出来的一种天然复合物，现已有商业供应 (Amersham Biosciences)。这种荧光聚酮化合物可以与蛋白结合，可能与赖氨酸残基作用从而发出荧光[26]。它比 SR 的灵敏度更高而且可与 MALDI-TOF 质谱技术兼容[25]。然而它也表现出染色饱和性[23]。

荧光素衍生物是另一种可选择的荧光染料。具有不同碳氢化合物链的 3 种荧光素衍生物的检测表明可作为凝胶染色的荧光染料[27]。在本章中，我们展示了 C16 荧光素的染色过程，它表现出较高的灵敏度和清晰的背景，而且没有饱和倾向[23]。

14.1.2 蛋白质组分析中选择染料的重要性

运用双相凝胶电泳技术进行的大规模蛋白质组学已得到广泛应用，比如遗传多样性的鉴定[28,29]、发育过程的分析[30,31]、生物和非生物胁迫的研究[32,33]等方面。在蛋白质组分析中染料的选择至关重要，其中操作时间、化学产品的成本、所需仪器、染料的敏感度以及其是否能与质谱兼容都是选择染料的依据。在近期工作中，我们比较了 5 种染料的染色方法以帮助实验者在通过图像分析的双相凝胶电泳的大规模比较中选择合适的蛋白质染料[23]。结果表明，当蛋白质上样量相同时，用不同的染料可检测到的蛋白质点数量相差近 3 倍，依次是 SR＞SN≈DP＞C16-F＞CCB。这与染料的敏感度不同有关，高敏感性的染料甚至可检出低丰度的蛋白质。不同染料染色结果的可重复性也有差异，从高到低依次为 SR＞C16-F＞DP＞SN＞CCB。

本章详细描述了 5 种染料的凝胶染色方案。为帮助读者选择合适的染色方案，我们展示了从拟南芥悬浮细胞中提取的 100μg 蛋白质样品的凝胶染色结果。

14.2 材　　料

所有溶液的配制和清洗都只能用超纯水。

14.2.1 蛋白提取和双相电泳

(1) 提取液：90%冷冻 (－20℃) 丙酮 (*V/V*)，10%三氯乙酸 (TCA) (*V/V*)，0.07%2-巯基乙醇 (*V/V*)。

(2) 洗涤液：90%冷冻 (－20℃) 丙酮 (*V/V*)，0.07%2-巯基乙醇 (*V/V*)。

(3) 溶解液：9mol/L 尿素，4% 3-［(3-胆酰氨基丙基) 二甲氨基］丙磺酸盐 (*m/V*)，0.05%Triton X-100 (*V/V*)，　65mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT)。

(4) 第一向电泳缓冲液：0.5%固相 pH 梯度 (IPG) 缓冲液 4～7 (*V/V*)，0.002% (*m/V*) 溴酚蓝。

(5) 还原溶液：50mmol/L Tris-HCl (pH 8.8)，6mol/L 尿素，30% (*V/V*) 甘油，2% (*m/V*) 十二烷基硫酸钠 (SDS)，130mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) (见注释 1)。

(6) 烷基化溶液：50mmol/L Tris-HCl (pH8.8)，6mol/L 尿素，30% (*V/V*) 甘油，2% (*m/V*) 十二烷基硫酸钠 (SDS)，130mmol/L 碘乙酰胺 (见注释 1)。

(7) 琼脂糖溶液：0.6% (*m/V*) 低熔点琼脂糖电泳缓冲液 (见 14.3.1 节 9)，含微量溴酚蓝。

(8) 丙烯酰胺凝胶溶液：11%丙烯酰胺，0.375mol/L Tris-HCl (pH 8.8)，0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS)，0.05% 过硫酸铵 0.0003%四甲基乙二铵 (TEMED) (见注释 1)。

(9) 电泳缓冲液：25mmol/L Tris，192mmol/L 甘氨酸，0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) (*m/V*) (见注释 1)。

14.2.2　胶体考马斯亮蓝 (CCB) 凝胶染色 (见注释 2)

(1) 固定液：50% (*V/V*) 乙醇，2% (*V/V*) 磷酸。

(2) 培育液：34% (*V/V*) 甲醇，2% (*V/V*) 磷酸，17% (*m/V*) 过硫酸铵。

先将过硫酸铵和磷酸加入水中混合 (300ml 总体积溶液中含 180ml 水)，然后边搅拌边将甲醇慢慢地加入到混合溶液中。

(3) 染色液：34% (*V/V*) 甲醇，2% (*V/V*) 磷酸，17% (*m/V*) 过硫酸铵，0.05% (*m/V*) 考马斯亮蓝 G-250。先将过硫酸铵、磷酸和考马斯亮蓝 G-250 加入水中混合 (300ml 总体积溶液中含 180ml 水)，然后边搅拌边将甲醇慢慢地加入到混合溶液中。

14.2.3　硝酸银 (SN) 凝胶染色 (见注释 3)

(1) 固定液：50% (*V/V*) 甲醇，12% (*V/V*)；乙酸，0.05% (*V/V*) 甲醛。

(2) 洗涤液：35% (*V/V*) 乙醇。

(3) 敏化液：0.02% (*m/V*) 硫酸钠。

(4) 染色液：0.2% (*m/V*) 硝酸银，0.076% (V/V) 甲醛。

(5) 显色液：6% (*m/V*) 碳酸钠，0.05% (*V/V*) 甲醛，0.0004% (*m/V*) 硫酸钠。

(6) 终止液：50% (*V/V*) 甲醇，12% (*V/V*) 乙酸。

(7) 贮存液：1% (*V/V*) 乙酸。

14.2.4　SR 凝胶染色 (见注释 4)

(1) 固定液：10% (*V/V*) 甲醇，7.5% (*V/V*) 乙酸。

(2) 染色液：商家提供的 200X Deep Purple 溶液用水稀释 200 倍。

(3) 洗涤液 1：0.1% (*V*/*V*) 氢氧化铵。

(4) 洗涤液 2：0.75% (*V*/*V*) 乙酸。

14.2.5 C16-F 凝胶染色（见注释 6）

(1) 固定和染色液：30% (*V*/*V*) 乙醇，7.5% (*V*/*V*) 乙酸，1μmol/L5-十六碳酰基荧光素。

(2) 洗涤液：7.5%乙酸。

14.2.6 仪器

(1) 双向凝胶电泳：标准的双向凝胶电泳仪器，使用固相 pH 梯度胶条进行第一向电泳［此处所示的凝胶类似 IPG-Phor 和 Dalt 体系［Amersham Bioscience，Buckinghamshire，UK)］。

(2) 图像获得：可见光扫描仪或密度计［此处所示的凝胶类似 GS-710 (Bio-Rad，Hercules，CA)］，多波长荧光扫描仪［此处所示的凝胶类似 FLA-5000 (Fuji Photo Film Company，Tokyo，Japan)］。

14.3 方　　法

14.3.1 可溶性总蛋白的提取方法（三氯乙酸/丙酮法）

(1) 从拟南芥细胞悬浮培养液中收集细胞。

(2) 液氮中研磨细胞。

(3) 向研磨好的细胞粉末中加入提取液，在−20℃放置至少 30min（见注释 7)。

(4) 42 000*g* 离心以除去不溶物，用洗涤液（见注释 8）清洗 3 次（见注释 8)。

(5) 将管子放置在空气中使其干燥。

(6) 在溶解液中振荡沉淀 2h 溶解蛋白（见注释 9)。

(7) 根据 Bradford 法[3,4]测定蛋白浓度，使用等份样品和血清白蛋白作标准曲线（等份样品是指相同比例的溶液)。

14.3.2 双向凝胶电泳

(1) 直接用第一向电泳溶液相匹配的 100μg 蛋白质溶液水化 IPG 胶条（18cm，pH4.0～7.0)。

(2) 进行等电聚焦直至 100kV/h。

(3) 进行第二向电泳前，在还原液中将蛋白质还原后再用烷化液将蛋白质进行烷基化处理，两者各 15min。

(4) 将胶条用琼脂糖溶液包埋在 11%的丙烯酰胺胶的顶端。

(5) 在电泳缓冲液中进行 SDS-PAGE，每块胶 15mA，10℃过夜（见注释 10)。

14.3.3 CCB 染色和成像（见注释 11、注释 12）

根据 Neuhoff 等[3]的方法对凝胶进行染色。每一步操作中，每块胶使用 300ml 溶液。所有操作均需振荡。

（1）将凝胶浸没在固定液中至少 2h 或者过夜以固定蛋白。

（2）用水清洗凝胶三次，共 30min。

（3）将凝胶转移到培育液中培育 1h（见注释 13），然后再转移到染色液中（见注释 13、注释 14）。

（4）轻微振荡，在染色液中显影 5 天。

（5）用水清洗凝胶，用扫描仪在 300dpi 分辨率下获取图像（图 14-1）。

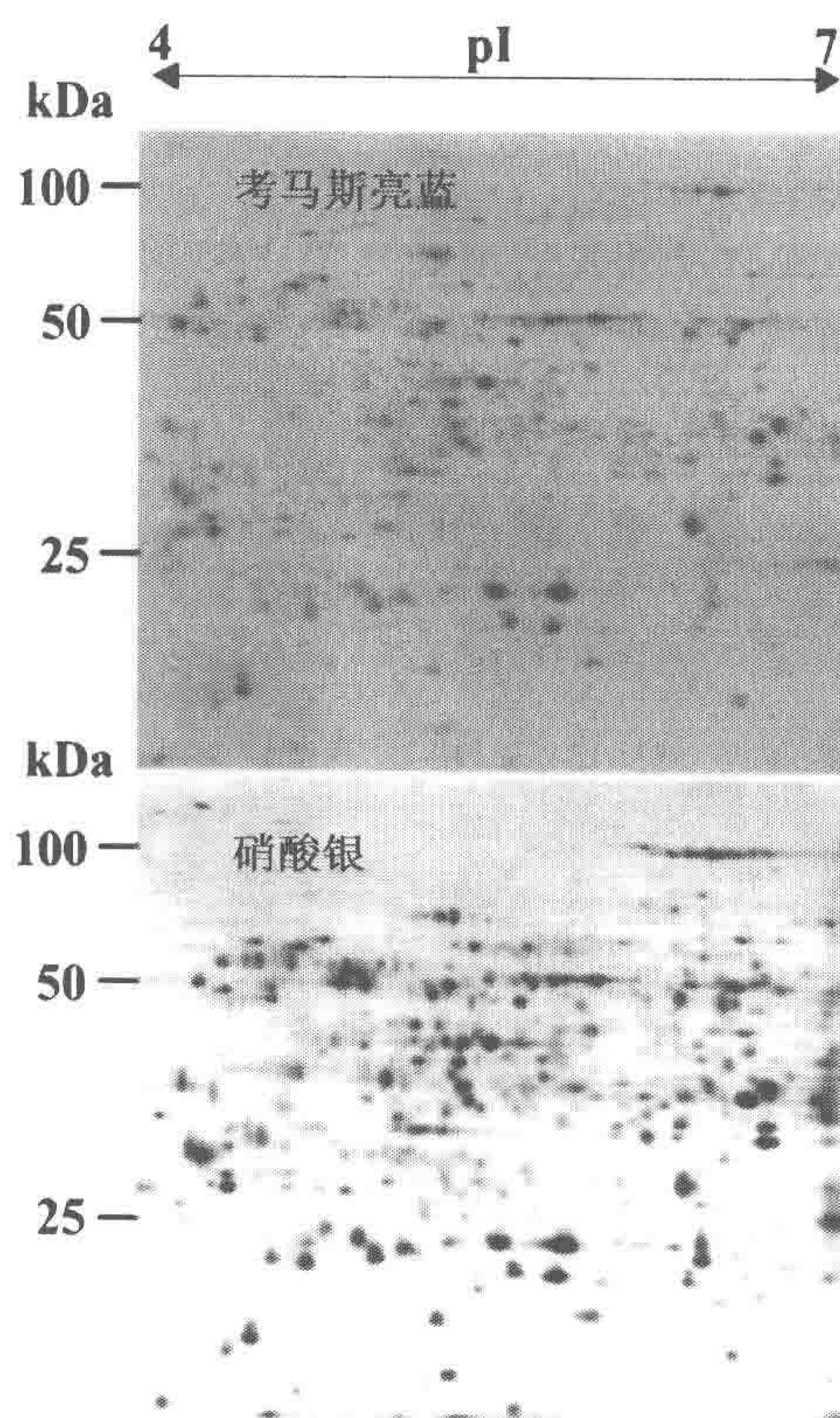


图 14-1　使用可见染料胶状考马斯亮蓝和硝酸银染色方法获得的凝胶图像

上样为 100μg 拟南芥组培细胞中提取的总可溶性蛋白

14.3.4 SN 染色和成像（见注释 11、注释 12）

根据 Mortz 等[15]的方法对凝胶进行染色。每一步操作中，每块胶使用 300ml 溶液。所有操作均需振荡。

（1）将凝胶浸没在固定液中至少 2min 或者过夜以固定蛋白质。

（2）用洗涤液清洗凝胶 3 次共 20min。

(3) 在敏化液中短时间浸泡凝胶(2min)(见注释15)。

(4) 用水清洗凝胶3次，5min。

(5) 在染色液中浸染凝胶20min。

(6) 用水快速清洗凝胶2次共1min。

(7) 将凝胶放入显色液中5～10min(见注释16)。

(8) 在终止液中终止显色5min后将凝胶转移到贮存液中。

(9) 使用扫描仪在300dpi分辨率下获得图像(图14-1)。

14.3.5　SR染色和成像(见注释11、注释12和注释17)

每一步操作中，每块胶使用300ml溶液。所有操作均需振荡。

(1) 将凝胶浸没在固定液中30min以固定蛋白。

(2) 凝胶在染色液中侵染至少30min(最多1h)。

(3) 用洗涤液清洗凝胶30min。

(4) 使用带473nm激光激发和长通道滤光镜Y510的FLA-5000分析仪获取图像。选择条件为100μm分辨率、16位灰度、光电管电压700V(图14-2)。

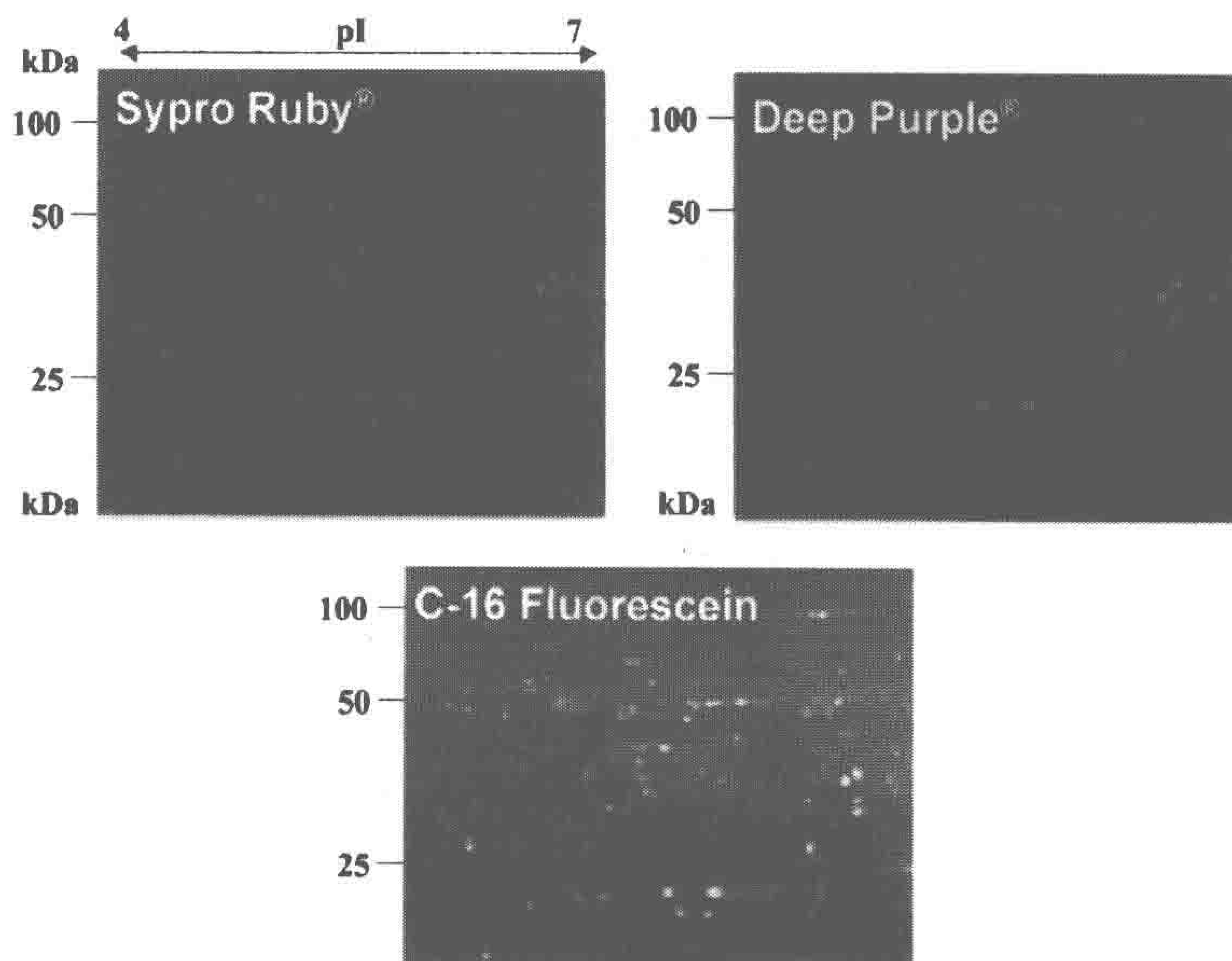


图14-2　使用荧光染料Sypro Ruby、Deep Purple和C-16 Fluorescein(十六碳酰基荧光素)3种染色方法获得的凝胶图像

样品为100μg拟南芥组培细胞中提取的可溶性总蛋白

14.3.6　DP染色和成像(见注释11、注释12和注释17)

每一步操作中，每块胶使用300ml溶液。所有操作均需振荡。

(1) 将凝胶浸没在固定液中1h以固定蛋白。

（2）用水清洗凝胶 4 次，每次 10min。

（3）凝胶在染色液中浸染 1h。

（4）用洗涤液 1 清洗凝胶 2 次、10min，然后再用洗涤液 2 清洗 2 次，10min。

（5）使用带 532nm 激光激发和长通道滤光镜 O575 的 FLA-5000 分析仪获取图像。选择条件为 100μm 分辨率、16 位灰度、光电管电压 700V（图 14-2）。

14.3.7　C16-F 染色和成像（见注释 10、注释 11、注释 17 和注释 18）

根据 Kang 等[27]的方法对凝胶进行染色。每一步操作中，每块胶使用 300ml 溶液。所有操作均需振荡。

（1）将凝胶浸没在固定液和染色液中对蛋白同时进行固定和染色。

（2）用洗涤液至少清洗凝胶 2 次，每次 5min。

（3）使用带 473nm 激光激发和长通道滤光镜 Y510 的 FLA-5000 分析仪获取图像，选择条件为 100μm 分辨率、16 位灰度、光电管电压 700V（图 14-2）。

14.3.8　染料间的比较

以上染色方法中，当上样为 100μg 拟南芥组培细胞中提取的总可溶性蛋白时，CCB 通常可检出 250 个蛋白质点，C16-F 可检出 450 个蛋白质点、DP 可检出 550 个蛋白质点、SN 可检出 600 个蛋白质点、SR 可检出 800 个蛋白质点（图 14-1 和图 14-2）。表 14-1中总结了这些方法的主要特征。根据染料类型、染色步骤和操作时间对染色方法进行了比较。图像质量通过背景效果、点饱和度和染料敏感度进行了评价。

表 14-1　染色方法实用特征的比较

项目	CCB	SN	SR	DP	C16-F
染料类型	可见	可见	荧光	荧光	荧光
染色步骤	4	8	3	5	2
时间	5 天	4h	3h	3h	3h
背景质量	+/−	++	+	+/−	−
点饱和度缺失	++	+/−	+/−	+/−	+
敏感度	+/−	+	++	++	+
成本	++	++	−	−	++

注：++. 非常好/便宜；+. 好；+/−. 中等；−. 不好/贵。

14.4　注　　释

（1）建议使用 Deep Purple 和高质量 SDS 进行染色的凝胶，避免非特异性染色和背景（比如 USB 的产品，Cleveland，USA）

（2）有不同来源的 CCB 可供使用，在本实验中，使用了考马斯亮蓝 G-250（Ref

161-0406，Biorad，Hercules，CA，USA）。

（3）有不同来源的 SN 可供使用，在本实验中，使用了硝酸银（产品批号 S-0139，Sigma-Aldrich，St. Louis，MO）。

（4）Sypro Ruby 由不同的供货商提供，在本实验中，使用了 SR（产品批号 1703125，Bio-Rad）。

（5）Deep Purple（产品批号 RPN6305，Amersham Biosciences，Buckinghamshire，UK）。

（6）5-十六碳酰基荧光素（产品批号 H-110，Molecular Probes，Eugene，OR）。

（7）蛋白通常在－20℃沉淀 30min 即可。建议延长贮存时间（－20℃过夜）以改善沉淀效果，尤其是体积小和（或）亲水蛋白分子。

（8）无上清液的管子可贮存在－20℃。

（9）可通过延长搅拌时间（过夜）和(或）使用水浴锅超声波进行短时间的超声处理来增加蛋白溶解度。

（10）经过 2h 的电洗脱（每块胶 15mA），蛋白质从胶条进入到第二向凝胶中，此时可将电流增加到 30mA 从而加快蛋白的迁移。

（11）第二向电泳完成后（当溴酚蓝前端到达凝胶的底端时），必须快速将凝胶转移到固定液中以限制蛋白质被动扩散。

（12）为限制对大型凝胶的操作和避免凝胶破裂，建议在连续的操作步骤中更换溶液时使用真空泵吸出溶液。

（13）配制 CCB 培育液和染色液时，应小心地将甲醇溶液（染色液中为考马斯亮蓝）慢慢加入到搅拌中的过硫酸铵溶液中。将甲醇溶液和过硫酸铵溶液混合时，过硫酸铵会沉淀，形成致密的结块。为避免这种情况发生，一定要小心的将甲醇溶液加入到过硫酸铵溶液中（将过硫酸铵溶解在 180ml 水中，定容到 300ml 终体积），切记不要将过硫酸铵溶液加入到甲醇溶液中。在混合过程中，会产生白色的过硫酸铵沉淀，只需加入少量的水使其复溶。

（14）为避免考马斯亮蓝结晶，使用前 2h 配制染色液。考马斯亮蓝需要先在甲醇中溶解 1h。甲醇和考马斯亮蓝溶液需与过硫酸铵混合至少 1h 以获得均匀的蓝色溶液。

（15）敏化是凝胶染色中一个快速而且重要的步骤，它允许银对蛋白质的进一步固定。这一过程要在无乙醇的溶液中完成，因为之前的过程中含有 35％的乙醇，凝胶容易漂浮。为避免这个问题，在敏化过程中可增加搅拌速度以及将敏化溶液体积增加 2 倍。

（16）可在 5～10min 内方便获得显影。由于将显色液换成终止液时此化学反应不会立即停止，需要预期染色终止时间有以限制蛋白质点的过度着色。

（17）在使用荧光染料时，所有的染色步骤都必须在黑暗中进行。可使用铝铂纸来包裹染色器皿。

（18）对 C16 荧光素染色来说，必须使用玻璃器皿以避免塑料器皿吸附染料。

参考文献

1. Van Wijk, K. J. (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* **126,** 501–508.
2. Patton, W. F. (2002) Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatogr. B.* **771,** 3–31.
3. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9,** 255–262.
4. Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., and Taube, D. (1990) Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with Coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11,** 101–117.
5. Scheler, C., Lamer, S., Pan, Z., Li, X. P., Salnikow, J., and Jungblut, P. (1998) Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* **19,** 918–927.
6. Rabilloud, T. (1990) Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11,** 785–794.
7. Patton, W. F. (2000) A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis* **21,** 1123–1144.
8. Rabilloud, T., Carpentier, G., and Tarroux, P. (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* **9,** 288–291.
9. Swain, M. and Ross, N. W. (1995) A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **16,** 948–951.
10. Rabilloud, T. (1992) A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* **13,** 429–439.
11. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* **68,** 850–858.
12. Larsson, T., Norbeck, J., Karlsson, H., Karlsson, K. A., and Blomberg, A. (1997) Identification of two-dimensional gel electrophoresis resolved yeast proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **18,** 418–423.
13. Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., and Mische, S. M. (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20,** 601–605.
14. Yan, J. X., Wait, R., Berkelman, T., et al. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21,** 3666–3672.

15. Mortz, E., Krogh, T.N., Vorum, H., and Gorg, A. (2001) Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics* **1,** 1359–1363.
16. Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E., and Rabilloud, T. (2004) About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* **4,** 909–916.
17. Berggren, K., Steinberg, T. H., Lauber, W. M., et al. (1999) A luminescent ruthenium complex for ultrasensitive detection of proteins immobilized on membrane supports. *Anal. Biochem.* **276,** 129—143.
18. Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T. H., et al. (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **12,** 2509–2521.
19. Berggren, K. N., Schulenberg, B., Lopez, M. F., et al. (2002) An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics* **2,** 486–498.
20. Steinberg, T. H., Chernokalskaya, E., Berggren, K., et al. (2000). Ultrasensitive fluorescence protein detection in isoelectric focusing gels using a ruthenium metal chelate stain. *Electrophoresis* **21,** 486–496.
21. Rabilloud, T., Strub, J. M., Luche, S., van Dorsselaer, A., and Lunardi, J. (2001) A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1,** 699–704.
22. Lopez, M. F, Berggren, K, Chernokalskaya, E, Lazarev, A, Robinson, M, and Patton, W. F. (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* **21,** 3673–3683.
23. Chevalier, F., Rofidal, V., Vanova, P., Bergoin, A., and Rossignol, M. (2004) Proteomic capacity of recent fluorescent dyes for protein staining. *Phytochemistry* **65,** 1499–1506.
24. Lamanda, A., Zahn, A., Roder, D., and Langen, H. (2004) Improved ruthenium II tris (bathophenantroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* **4,** 599–608.
25. Mackintosh, J. A., Choi, H. Y., Bae, S. H., et al. (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3,** 2273–2288.
26. Bell, P. J. and Karuso, P. (2003) Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 9304–9305.
27. Kang, C., Kim, H. J., Kang, D., Jung, D. Y., and Suh, M. (2003) Highly sensitive and simple fluorescence staining of proteins in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide-based gels by using hydrophobic tail-mediated enhancement of fluorescein luminescence. *Electrophoresis* **24,** 3297–3304.
28. Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., et al. (1999) Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* **20,** 2013–2026.
29. Marquès, K., Sarazin, B., Chané-Favre, L., Zivy, M., and Thiellement, H. (2001) Comparative proteomics to establish genetic relationships in the Brassicaceae family. *Proteomics* **1,** 1457–1462.
30. Santoni, V., Delarue, M., Caboche, M., and Bellini, C. (1997) A comparison of

two-dimensional electrophoresis data with phenotypical traits in *Arabidopsis* leads to the identification of a mutant (cri1) that accumulates cytokinins. *Planta* **202,** 62–69.

31. Gallardo, K., Job, C., Groot, S. P., et al. (2002) Proteomics of *Arabidopsis* seed. *Plant Physiol.* **129,** 823–837.
32. Costa, P., Bahrman, N., Frigerio, J. M., Kremer, A., and Plomion, C. (1998) Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* **38,** 587–596.
33. Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinsot, V., et al. (2002) Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **23,** 122–137.
34. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.

第15章　番茄叶和根二维差异凝胶电泳（DIGE）

Matthew Keeler，Jessica Letarte，Emily Hattrup
Fatimah Hickman 和 Paul A. Haynes

摘要　在本章中，我们提供了一个详细的方法来分析同一植物两个不同组织器官蛋白的差异表达。这个方法包括收集成熟番茄的叶和根，从收集的组织中制备蛋白质提取物，在差异凝胶电泳前荧光标记样本，一维和二维电泳分离以及图像定量差异蛋白表达量。这种方法广泛适用于植物材料并且可以用来研究植物应答生物胁迫、非生物胁迫、遗传操作、选育育种及其他方面的蛋白质表达差异。另外，除了具体阐述实验方法以外，我们还给出了一个具有代表性的分析番茄的根在盐处理及非处理情况下的蛋白表达微量变化的实验结果。

关键词　二维蛋白凝胶电泳；差异凝胶电泳；荧光差异双相电泳；植物蛋白；番茄；CyDye 蛋白标记；差异波长荧光成像

15.1　前　　言

蛋白质组学的一个主要研究技术是高分辨率的二维凝胶电泳技术（2-DE）[1,2]。这项技术通常运用一维的电荷分离蛋白（等电聚焦）和二维的分子质量分离蛋白（SDS-PAGE）。一个二维凝胶系统的上样量可以达到毫克级并且可以分离数千个蛋白质点。虽然这项技术运用非常广泛，但是还是有一些技术上的限制。由于实验条件及主要蛋白溶解度的微小变化，在一个 2D 凝胶上的蛋白质表达模式不能准确地重复。这使得要精确研究蛋白质表达差异时的微小变化非常困难，并且要精确定量蛋白质含量的微小变化将更加困难。运用不同的程序软件比较分析在相同凝胶上的不同样本尽管可行，但要精确比较蛋白质点，需要对大量的图片进行处理和分析。可用的、有限的高动态蛋白标记技术及上述方面限制了二维蛋白质凝胶电泳中蛋白质点的分析速度和准确定量。

2D-DIGE 技术[7]是在 2D 凝胶技术的基础上增加了一个准确定量的元件。它可以在比较多个样本的蛋白质丰度变化的同时，对置信度进行统计学分析[8,9]。比较蛋白样品时是先用蓝色荧光染料标记，然后再混合，最后在相同的 2D 凝胶中进行分离。这样消除了蛋白在不同凝胶上的漂移，因此定量更准确。用 Cy 染料可以检测超过 4 个数量级的蛋白质丰度变化[8]。在合适的染料激发波下，通过持续获得的荧光成像，可以得到较为清晰的 2D 凝胶图像。为了尽量使一个蛋白质只标记一个分子的染料，蛋白质与染料的比率可以高达 20∶1。在电泳时为了减少染料基团引起的蛋白质漂移，荧光染料的电

荷与质量要很好地协调。通过在两个波长下对DIGE胶扫描后获得的图像进行大量的比较，可以定量分析同一个位点的同一个蛋白质或多个蛋白质。第三种染料的使用使得内标是可行的，它可以通过比较不同样本的一系列相应的凝胶图片来标准化数量。

然而DIGE技术还有本身的局限性。实际情况是，凝胶上只有一小部分的蛋白质被标记，也就是当荧光位点从胶上切下进行下一步分析时，大多数的蛋白质还留在胶里，特别是一些小分子蛋白质，甚至单个染料分子就可以在蛋白质迁移中引起变化。为了避免这种现象，可以在荧光成像分析后再用Sypro ruby[10]或银染胶（正如我们在这篇报道中所描述的）。反过来，为了确保挖点正确，特别是在点多的区域时，比较这种荧光染料以及后染的图片也会产生一些问题。不过这仍是一种比较好的选择。另外一种可供选择的方法是用不同的试剂来标记蛋白质至饱和来避免这种问题，这种方法有所报道[11]，但没有被广泛使用。

来自于DIGE的量化分析的意义是另外一个争论热点。这种体系现在只有Amersham Biosciences（GE Healthcare的一部分）拥有，但非常昂贵。合成并使用商业化的蓝色染料*N*-羟基丁二酰亚胺活化酯可避免这个问题[12]。deCyder软件可以识别蛋白质表达变化，统计学上非常有意义。用软件模式比较荧光强度相对于传统的手工调节图像的亮度及对比度而言将更客观、准确。为了避免曲解实验结果，两个样品的蛋白上样量要尽可能接近。由微小蛋白质的溶解性不同而不是电泳参数的原因造成的漂移，使用者至少要重复实验结果。有人试图通过DNA表达情况结合蛋白质组学数据[13]及另一种标准运算法则[14]来克服这些问题。对不同胶上的样品进行更加准确的量化可以通过在一个更加复杂的方案中使用3种蓝色染料包括内标的使用来实现[15]。

2D-DIGE在不同的生物学领域得到大量的运用，如食道[10]、胃[16]、结肠[17]、乳腺癌[18]、白血病细胞[19]、鼠肝脏毒性[20,21]、脑组织[22,23]及逆境胁迫下大肠杆菌[24]及酵母[12]的蛋白质变化分析。然而据我们了解，2D-DIGE在植物蛋白质制备方面还没有公开的研究报告，这很可能是因为在植物组织蛋白质提取物的制备中，混合了大量的其他有机物质，这使得这种2D胶有些问题。这些物质包括复杂的碳水化合物、DNA、有机酸、多酚和其他的成熟植物的结构成分。我们实验室采用2D-DIGE技术进行了番茄响应热激、光照及盐胁迫下的蛋白质表达情况研究。首先，我们采用三氯乙酸（TCA）/丙酮沉淀的方法制备了叶或根组织的蛋白质提取物，这种方法在以前的许多研究中运用过[25-28]。清洗TCA/丙酮粉末水洗多余的酸，然后用含硫脲的缓冲液萃取2D胶样品缓冲液萃取。接着再测定每个样本的蛋白质含量，调节浓度使得每个样本的蛋白质含量一致，蓝色素标记蛋白质提取物后混合，再进行一维等电聚焦电泳。

用此种方法我们已经准确定量分析了番茄响应非生物胁迫的蛋白质的变化。我们还通过纳升液相色谱技术（nanoLC）结合质谱技术（nanoLC-MS/MS）以及数据库搜索定性分析了这些蛋白质。接下来我们详细地描述了番茄叶、根组织的蛋白质提取、CyDye标记、2-DE、荧光成像及再染色的方法。我们还展示了番茄根在盐胁迫下差异蛋白表达情况的实验结果。

15.2　材　　料

15.2.1　仪器

（1）Bio-Rad PROTEAN IEF细胞等电聚焦电泳仪。

(2) Bio-Rad 24cm 等电聚焦托盘及盖

(3) Amersham Biosciences Ettan DALT six Electrophoresis Unit

(4) Amersham Biosciences Ettan DALT

(5) Amersham Biosciences Electrophoresis

(6) Amersham Biosciences Typhoon 多波长荧光扫描仪。

(7) Thermolyne Maxi Mix Ⅱ型涡旋器。

(8) Eppendorf 5415D 型离心机。

(9) Beckman Coulter Avanti J-20 型离心机。

(10) Sigma Aldrich Micro SD 型离心机。

(11) Fisher Scientific 恒温培养箱。

(12) 陶瓷研钵、捣锤。

(13) 用来制备 24cm×20cm 聚丙烯酰胺凝胶的低荧光玻璃(The Gel Company,旧金山,美国加利福尼亚州)

15.2.2 耗材

Amersham Biosciences 24cm pH3.0～10.0NL 的干胶条。

15.2.3 化学试剂、缓冲液及溶液

(1) Milli-Q 超纯水(电阻率 18mΩ)。

(2) 叶片悬浮缓冲液:10%TCA(EMD Chemical,Gibbstown,NJ),丙酮溶液含 0.07%(*V/V*)巯基乙醇(EMD Chemical)。

(3) EDTA 水溶液:丙酮溶液含 0.07%(*V/V*)巯基乙醇,2mmol/LEDTA。

(4) 100mmol/L Tris-HCl pH8.5(Sigma,St. Louis,MO)。

(5) 硫脲缓冲液:2mol/L 硫脲,7mol/L 尿素,2%二硫苏糖醇(DTT)(*m*/V),4%3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)(*m*/V)

(6) *N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF)。

(7) CyDye DIGE 荧光染料 Cy2、C3、Cy5。

(8) 10mmol/L 赖氨酸。

(9) 固定 pH 梯度的缓冲液:0.012%,Amersham Bioscience De Streak 试剂、2mol/L 硫脲,7mol/L 尿素,2%(*W/V*)DTT,4%(*W/V*)CHAPS,2%IPG 缓冲液,pH3～10NL,少量溴酚蓝。

(10) 矿物油。

(11) 乙醇。

(12) 冰醋酸

(13) 亲和硅烷和剥离硅烷。

(14) 亲和硅烷工作液:8ml 乙醇,200μl 冰醋酸,1.8ml Milli-Q 超纯水,10μl 亲和硅烷。

(15) 40%丙烯酰胺储液(40%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺 37.5∶1,2.6%C)。

(16) 1.5mol/L Tris-HCl,pH8.8。

(17) 10%SDS 溶液（*m/V*）。

(18) 10%硫酸铵溶液（*m/V*）。

(19) *N*，*N*，*N*，*N*-四甲基二乙胺（TEMED）。

(20) 还原再平衡缓冲液：50mmol/L Tris-HCl，6mol/L 尿素，30%甘油（87%），2%SDS，0.5%DTT。

(21) 烃化重平衡缓冲液：50mmol/L Tris-HCl，6mol/L 尿素，30%甘油（87%），2%SDS，4.5%碘乙酰胺。

(22) SDS 电泳缓冲液：25mmol/L Tris-HCl，192mmol/L 氨基乙酸，0.2%SDS。

(23) 0.5%（*m/V*）琼脂糖封闭液：0.5%（*m/V*）琼脂糖（Bio-Rad），25mmol/L Tris-HCl，192mmol/L 氨基乙酸（Bio-Rad），0.2%（*m/V*）SDS，溴酚蓝，用之前用微波加热使琼脂糖液化。

15.3 实验方法

15.3.1 叶和根组织的收集和沉淀蛋白

(1) 从植物的中部切取绿色叶片，迅速放入塑料袋里冷却。如果没有冰箱，可先放到冰上，再放入−20℃保存。

(2) 对于根部组织，从茎部下面切一寸的根，摇晃根部并迅速放入水中洗掉泥土，连续洗 3 次，然后再迅速放入塑料袋里速冻或放在冰上暂时保存。

(3) 称取 2.5g 速冻的根及叶组织，除去多余的茎及其他杂质，用预冷的剪刀将这些组织剪成小碎片，放入预冷的研钵中，在液氮中磨碎。

(4) 将这些研碎的根叶组织放入 40ml 离心管中，用 25ml 悬浮缓冲液悬浮这些粉末，用力摇晃混合，放−20℃保存 45min，再摇，35 000*g* 离心 15min。

(5) 除去上清液，不搅动沉淀，用相同体积的 EDTA 水溶液洗沉淀（见注释 1），放冰上 3～4min。35 000*g* 离心 15min，至少再洗两次，直到沉淀不再是绿色。

(6) 沉淀冷冻干燥，直到变成灰褐色。它含有蛋白以及细胞壁和纤维等其他物质。

15.3.2 从 TCA/丙酮粉末中制备蛋白样本

(1) 称取 15mg 的 TCA/丙酮粉末（15.3.1 中制备好的沉淀），放入 1.5ml 的离心管。

(2) 向每一个离心管中加 1ml 的 100mmol/L Tris-HCl（pH 8.5），涡旋 1min，18 000*g* 离心 10min，去掉上清液（见注释 2）。

(3) 向每个离心管中加 1ml 的硫脲缓冲液，从粉末中萃取蛋白质，涡旋 5min，超声 10min。然后在摇床中摇 30min。

(4) 18 000*g* 离心 10min，取上清液。上清液中含有从叶组织中抽取的蛋白质，浓度为 0.5～1μg/μl。

15.3.3 制备 CyDyes 染料及蛋白荧光标记

(1) 用新鲜的 DMF 制备 CyDyes（见注释 3），因 DMF 容易氧化降解，所以制备

CyDyes 染料时要用新鲜的 DMF。

(2) 制备 CyDyes 溶液，每 1μl CyDyes 染料中加入 1.5μl DMF。1ml CyDyes 溶液用来标记 50μg 的蛋白质（见注释 4）。由于 CyDyes 对光敏感，故需用锡箔纸包住离心管，放在黑暗中保存。

(3) 每个样品吸 100μL（含有 50μg 的蛋白质）放入 0.6ml 的离心管中（见注释 5)，这时候样品还是分开的，一个样品中放入 1μl Cy3 工作液，另外一个样品中放入 1μl Cy5 工作液（见注释 6)。

(4) 涡旋 10s，短暂离心，重复两次。

(5) 在冰上放置 30min，避免光照。

(6) 每个样品中加入 1μL10mmol/L 赖氨酸来终止反应，然后在冰上放置 10min。

(7) 每 100μl 荧光标记的样品加入 250μlIPG 缓冲液，终体积为 450μl（见注释 7)。

15.3.4 第一向蛋白质分离：等电聚焦

(1) 将 Bio-Rad 聚焦托盘放入 Bio-Rad 的聚焦室内。吸取样品放入中间的托盘内，避免气泡产生。

(2) 用镊子去掉 IPG 干胶条的塑料皮，放入托盘里，确保阳极连着托盘的阳极，阴极对着阴极，仔细抬高胶条的一端，放下胶条的另外一端，确保整个胶条都能被缓冲液浸泡，还要确保没有气泡产生。

(3) 用矿物油覆盖胶条，防止通电时胶条变干。

(4) 通常完全聚焦需要最少 67 000V · h

a. 推荐程序：水化 50V 12h，500V 1h，1000V 1h，8000V 9h，100V 5h。

b. 第一步为水化，不能少于 12h，由于 Cy 染料对光敏感，所以聚焦托盘应该覆盖避免光照，或者整个仪器放在黑暗房间中使用。

c. 最后一步是移除窗口，胶条在这期间能够取出。低电压确保胶条能够完全聚焦，直到从托盘中取出。

15.3.5 SDS-PAGE 二向凝胶的准备

(1) 低荧光玻璃板减少背景的干扰。

a. 为了扫描时易于操作，玻璃板凝胶接触的一面要涂抹亲和硅烷。为了凝胶好剥离下来，凝胶接触的另一面要涂抹剥离硅烷。

b. 用 Milli-Q 超纯水和纸巾擦拭低荧光玻璃板不接触胶的那面，用乙醇和纸巾再擦拭一遍。

c. 每次加 0.5ml 亲和硅烷工作液到不接触胶的那面，用纸巾使之均匀分散，直到每块板总的工作液有 1ml。

(2) 先用乙醇擦拭玻璃板，接着用水擦，逐渐加入 0.5ml 剥离硅烷直到每块玻璃板都抹上了 1ml 的剥离硅烷，干燥 5～10min，除去多余液体。

(3) 将玻璃板放在干净的地方干燥至少 3h，注意亲和硅烷和剥离硅烷处理的玻璃板要分开放置。在灌胶前用氮气吹走玻璃板上的灰尘。

（4）将纸质圆点标记放于用亲和硅烷处理过的那面。每一个标记应当放在离板边缘约 1.5cm 的短边的中点。根据编号系统，标记也应当放置在板边缘约 1.5cm 处的底部。这样可以在随后的每一个处理步骤中区分不同的凝胶。

（5）12.5%凝胶的制备（总共 900ml，可以灌 12 块胶）：281ml 40%丙烯酰胺储液，225ml 1.5mol/L Tris-HCl pH8.8，376 ml Milli-Q H_2O，9ml 10%SDS，9ml 10%过硫酸铵，125 μl TEMED。先将丙烯酰胺、Tris-HCl、Milli-Q H_2O 和 SDS 放入大烧杯中彻底混合，再过滤这种混合物（0.2μmol/L），然后放入一个贮存器中，贮存器通过一个蠕动泵和灌胶室连接。

（6）打开搅拌器，迅速加入过硫酸铵和 TEMED（15s 内），打开蠕动泵。

a. 当几乎所有的混合液被泵入时，打开混合器侧面让尽可能多的混合液泵入。

b. 在空气进入管道前，加入置换液到软管室。

c. 继续缓慢灌胶，直到 12.5%的溶液刚好低于不接触胶板的顶部。

（7）关上泵，加入水饱和的丁醇以确保覆盖住胶的顶部和下部（丁醇在分隔液的上部），放置 1h，然后倒掉丁醇，覆盖 Milli-Q H_2O。

（8）胶最好是在室温放置过夜，当彻底凝固时再用。拆除灌胶仪器，洗掉玻璃板上的丙烯酰胺。立刻用胶或者放冰箱暂存（最多可以保存一个星期）。

15.3.6　二向蛋白质分离：SDS-PAGE

（1）从托盘中取出等电聚焦胶条，用 Kimwipe 轻轻擦拭胶条的前后端以除去过多的矿物油，小心不要将 Kimwipe 触到胶条，如果需要干胶条可以保存在−80℃冰箱中。

（2）将胶条放在平衡托盘中，一端稍高放置。

a. 在摇床上，用 2ml 新鲜的还原再平衡缓冲液洗胶条 30min。

b. 弃还原再平衡缓冲液，加 2ml 新鲜的烷基化再平衡缓冲液。

c. 摇床摇 30min，弃烷基化平衡缓冲液

d. 加 2mL SDS 电泳缓冲液，摇床摇 5min。

（3）仔细将胶条放入预先制备好的 24cm 的凝胶上（见 15.3.5 节），将胶条的塑料一端靠在玻璃板的一端，这样使胶条容易、方便放置在凝胶上，胶条和凝胶之间不能有气泡，用 0.5%（*m/V*）的琼脂糖密封液密封胶条，吸取密封液，放置在胶条上部，室温凝固。

（4）将凝胶的胶板放入与循环的冷水系统相连的 Ettan DALTsix 电泳室里。

a. 将胶放在小槽的外部，当同时跑几块胶时，将它们均匀地放在两边，面向同一个方向。

b. 将空胶板放在池子里，直到每个槽都放满。

c. 灌入电泳缓冲液，直到到达最大刻度线的底部。

d. 将盖子与底部电源接通，开始电泳。

e. 如果是过夜电泳，设置电量为 2W/gel。如果只在白天电泳，可以提高电压，但不要超过 8W/gel。

15.3.7　荧光图像扫描

（1）打开 Typhoon 扫描仪，在使用前先预热 30min，预热是为了扫描更精确。

（2）在使用前后都必须用乙醇和擦拭纸将玻璃板擦干净。不要用纸巾擦拭，因为容易刮伤玻璃面。

（3）将玻璃板从胶槽中取出，表面擦干净，将玻璃 cassettes 中的荧光标记凝胶按正确的方向放在玻璃板上。

（4）用合适的滤波和波长来扫描图像，每种标记物的波长如下：Cy3 用 580BP 的滤波，532nm 的绿色激发光；Cy5 用 670BP 的滤波，633nm 的红色激发光；Cy2 用 520BP 的滤波，488nm 的蓝色激发光。初始参数为 depth＋3mm，600V 光电倍增管设置和 500μm 的像素，反复进行 50～100μm 的像素高分辨率扫描。

（5）用 Typhoon 扫描仪软件可以获得图像，用数据集格式保存在包含 gel 图像的相关文件夹中，这样可以用 ImageQuant 打开，然后可以用数据集格式再保存，用来在 DeCyder 作进一步的处理。或者 Tiff 格式，可以使用其他图像分析包来做进一步的处理，如 Progenesis（Nonlinear Dynamics）。

15.3.8　图像分析

通过不同波长所获得的图片用 DeCyder 进行比较分析（见注释 8），由于程序复杂，在此不作详细介绍，基本步骤如下所述。

（1）为了确保图像大小完全匹配，用 Process Image 测量而且进行标准化，产生一个柱状图，显示两张图片中没有产生变化的、增加的、减少的蛋白质点数量。

（2）使用排除过滤法，或手动删除任何明显的非蛋白质背景斑点或条纹。按照需要，调整柱状图的临界参数显示蛋白质点。这些蛋白质点是指定量的上调或下调表达，如大于 2 倍的差异。

（3）手动检查柱状图和图像，以确定哪些点有明显表达变化，而且有足够的量用于质谱鉴定。在大多数情况下，许多蛋白质尽管有显著差异表达，但由于量很少以致于无法进行可靠的定量和可行的鉴定。最值得研究的蛋白质点通常具有中、高丰度而且差异表达非常明显。

（4）为了更精确地定量差异表达，特别是差异性非常微弱的情况下，整个程序需要重复 3 次，这样结果才有统计学意义（见注释 8）。

15.3.9　为了进一步处理进行再染

接下来是进行图像分析。取走玻璃盒里的隔条，胶进行银染[29,30]。银染要在固定的玻璃板上进行，这样可方便观察，并且可以手工挖取蛋白质点，以进行下一步的质谱鉴定[6]。相对于 CyDye 标记只能标记少部分蛋白质而言[8]，银染能保证绝大多数的蛋白质都能标记上。通过银染，用 CyDye 标记的大部分蛋白都能看见，尽管在不同的样品之间还是有一些变化。比对银染的图像和 CyDye 图像，小心确保挖到正确的点。一些小分子质量的 CyDye 通常会引起一些漂移，一些蛋白用不同方法也会引起一些差异（见注释 9）。

15.3.10 结果分析：番茄根部响应盐胁迫的蛋白质表达差异测定

1. 盐胁迫处理

（1）在控温温室里，让番茄（*Lycopersicon esculentum*，Betterboy variety）长到 4 英寸（1 英寸=25.4mm）高。

（2）在试种时，将 20 棵幼苗在包含 MiracleGro 肥料的 Hoglan 混合肥料中生长。

（3）所有 20 棵植株每天正常浇水。20 天后，对其中的 10 株进行标记，用 25mmol/L NaCl 处理一个星期。在此后的一个月时间里，逐渐将 NaCl 浓度提高到 100mmol/L。

（4）10 株对照植物在整个期间都用水浇灌。

2. 叶和根组织的收集

（1）在 7 个星期期间，在连续浇灌了两个星期的 100mmol/L 氯化钠之后，剪下 3～5g 对照及处理的健康植株叶片，一个星期两次，直到叶片坏死。

（2）一旦叶片坏死，植株连根拔起，用水冲洗根部，从根的中部分成近茎端和远茎端两部分，立刻液氮中进行速冻。

3. 近茎端蛋白质的抽提

（1）用研锤将收集到近茎端根研碎。

（2）按 15.3.1 节提到的 TCA 丙酮方法制备蛋白质沉淀物。

（3）由于凝胶上显示根所含的蛋白质比叶少，有必要按 15.3.2 节的方法抽提 3 次蛋白质，将这 3 次抽提的蛋白质放入到一个离心管中，进行 CyDye 标记。

（4）汇集样品，跑胶用 15.3.3 节、15.3.6 节的方法分析，结果见图 15-1～图 15-4。

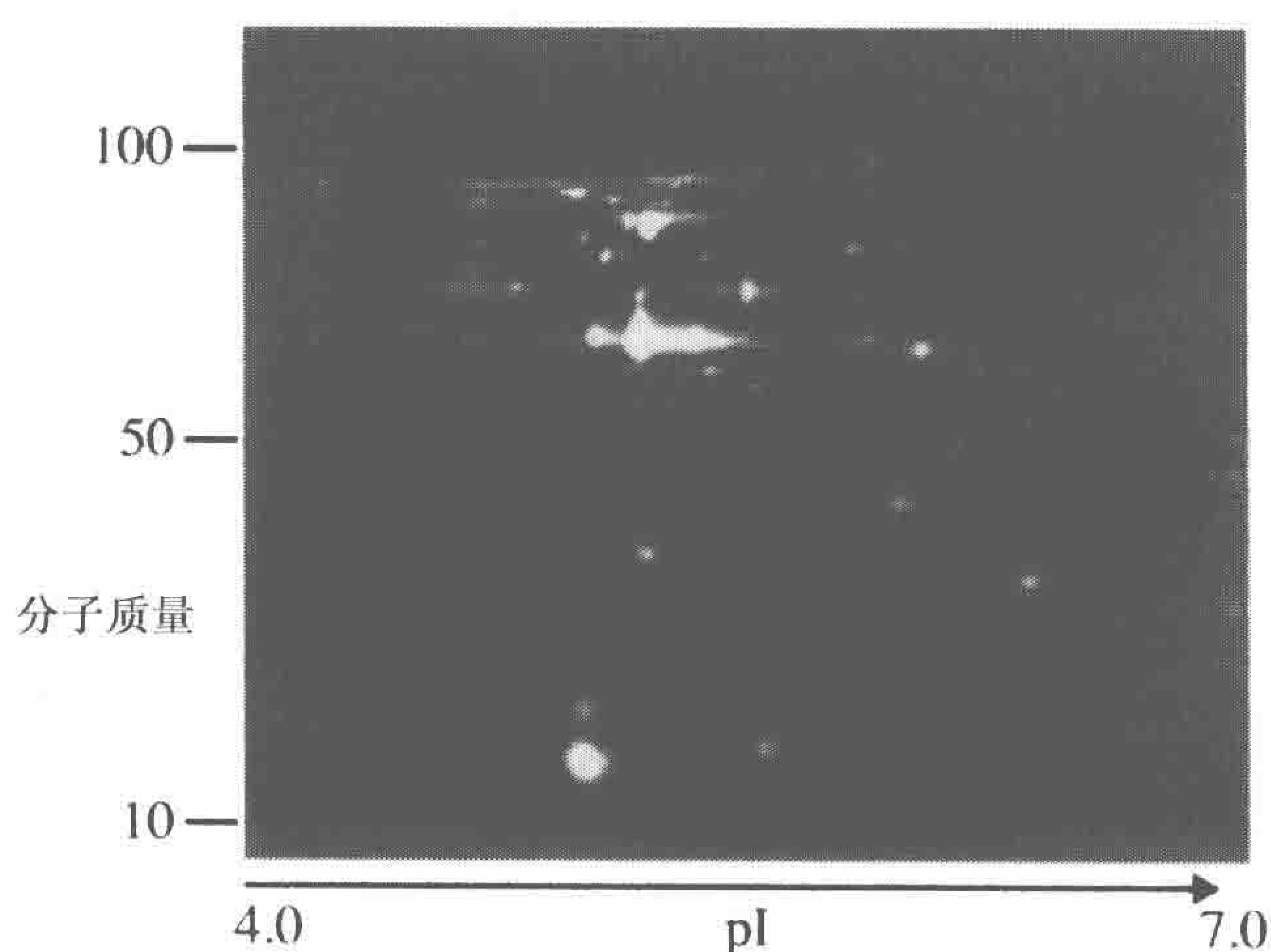


图 15-1 来源于 DeCyder 程序的起始扫描凝胶图片，用来分析如 15.3.10 节所示的蛋白样品。黄色表示两个样品表达量相同的蛋白点，绿色表示只在 Cy3 标记样品中出现的蛋白点，红色表示只在 Cy5 标记样品中出现的蛋白点。x 轴表示 pI 值，y 轴表示明显的分子质量（kDa）（译者注：原书中此图即为黑白图）

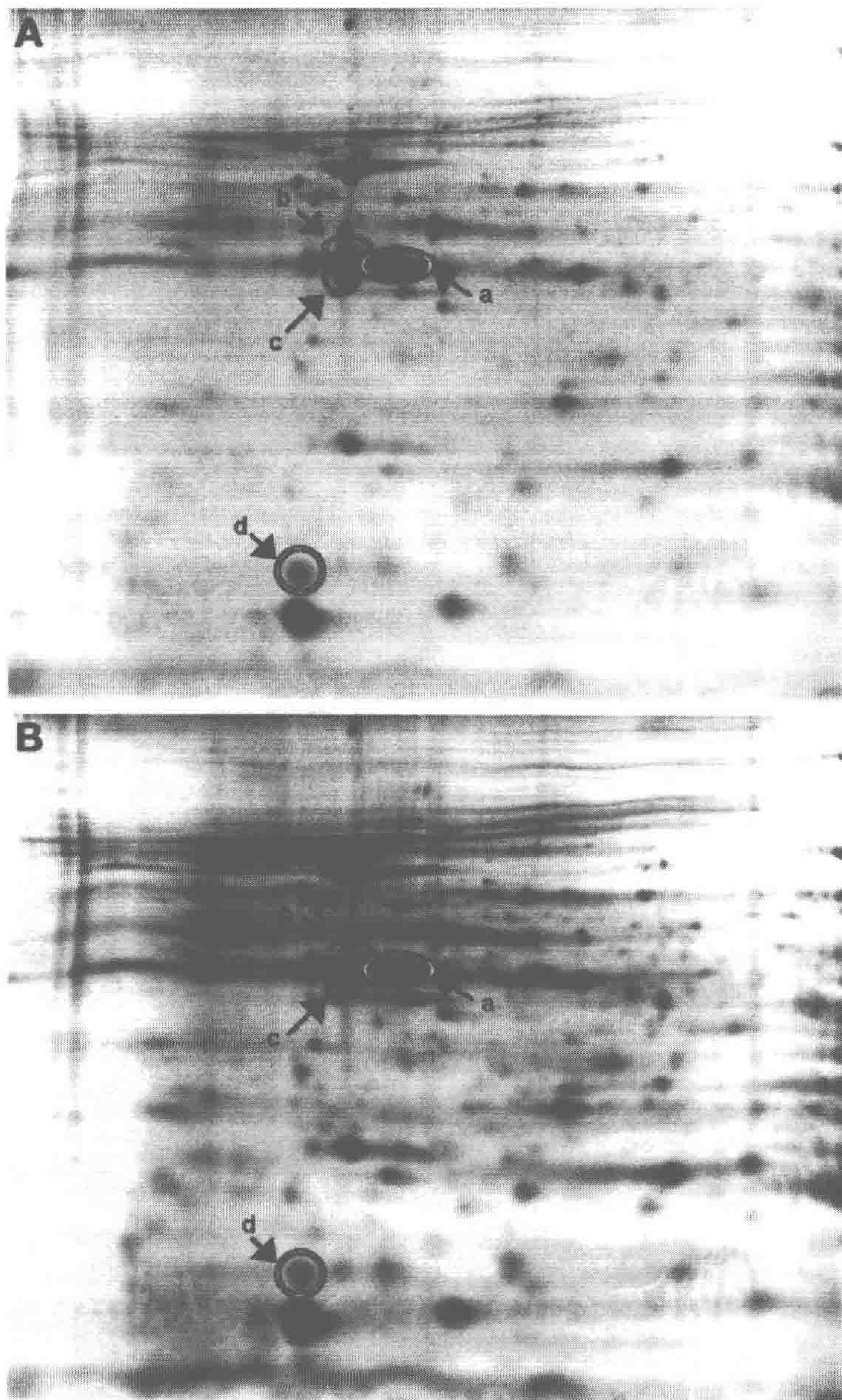


图 15-2　(A) 图 15-1 所示凝胶的单频道荧光扫描图，只显示 Cy3 荧光波长下的蛋白质点。标记为 a～d 的蛋白质点对应于图 15-3 上的蛋白质点，代表了 Cy3 标记的表达量超过 1.5 倍的蛋白质点；(B) 图 15-1 所示凝胶的单频道荧光扫描图，只显示 Cy5 荧光波长下的蛋白质点，标记了同样的蛋白质点

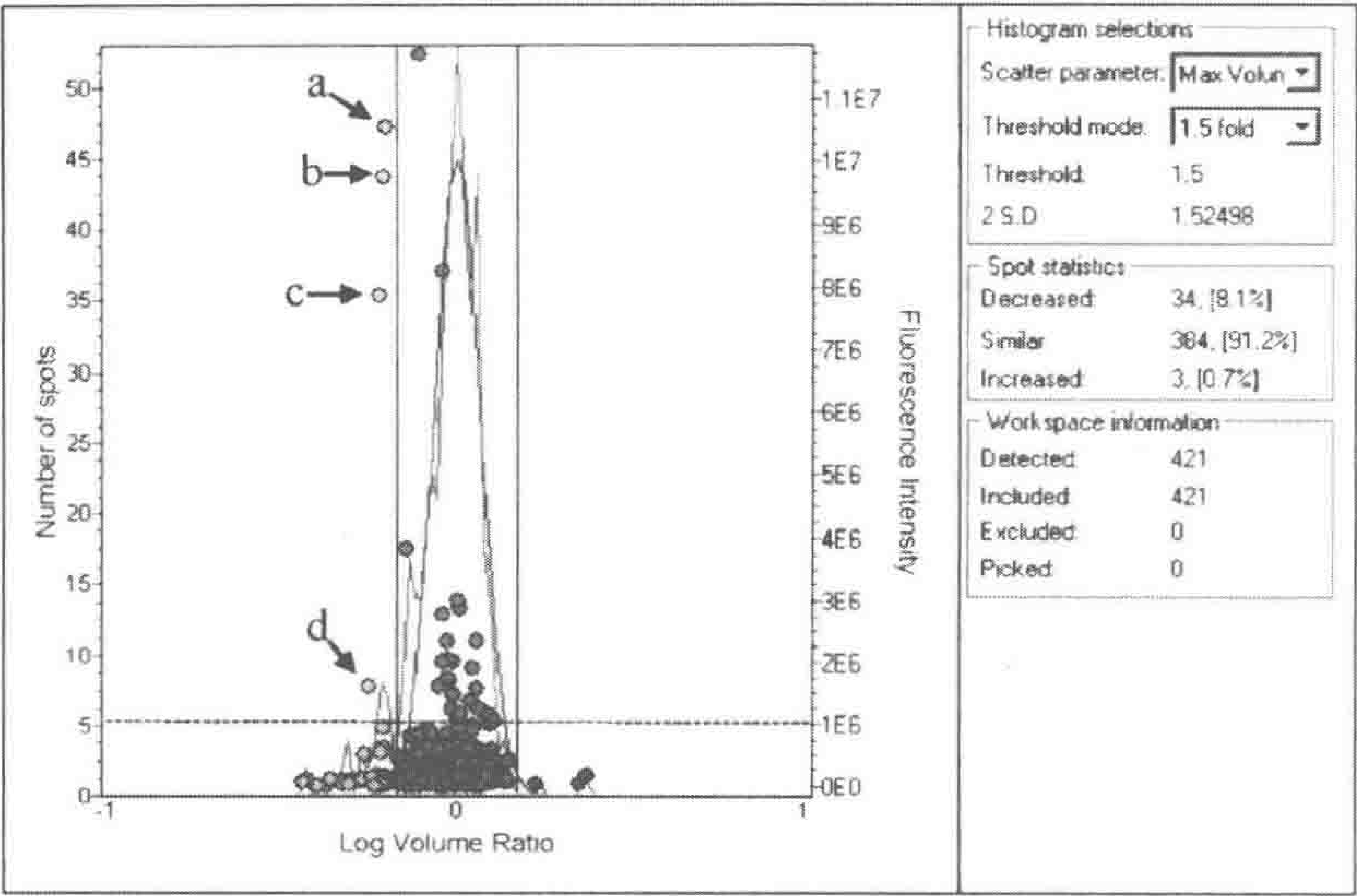


图 15-3　图 15-1、图 15-2 中蛋白质点的表达量柱状图。x 轴为两个图片的蛋白质点的体积的log 值的比率，左边的 y 轴蛋白质点的频率，右边的 y 轴为代表每个蛋白质点的绝对荧光强度。蓝色曲线表示了蛋白质点频率模式柱状图，这是基于红色曲线的实际柱状图生成的。标记为 a～d 的 4 个蛋白质点，x 轴上在正常分布曲线之外，y 轴上超出了虚线所示的阈值，代表 Cy3 标记的表达量超过 1.5 倍的蛋白质点，这些点对应于图 15-2 标记的蛋白质点（译者注：原书中此图即黑白图）

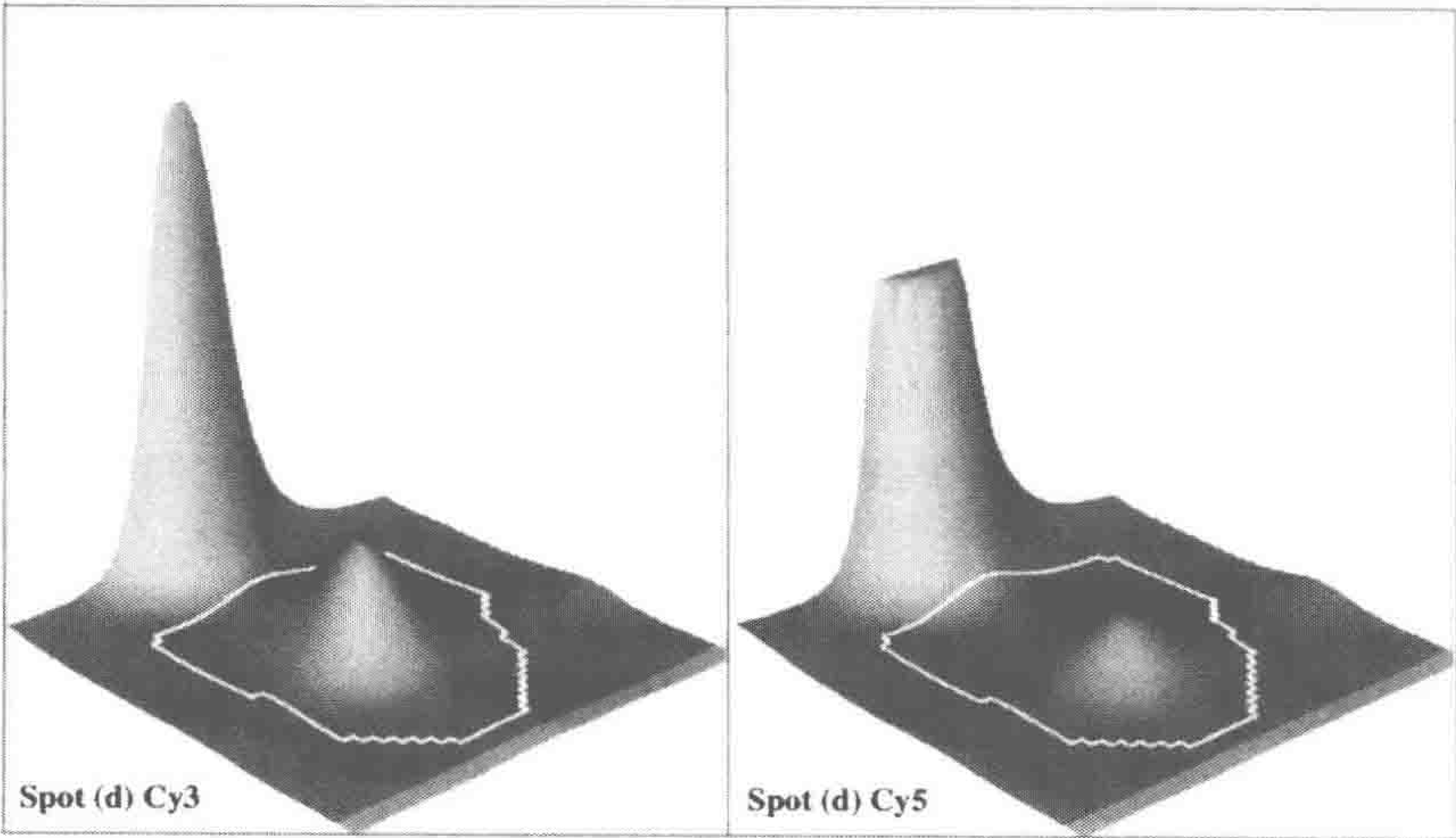


图 15-4　图 15-2、图 15-3 中蛋白质点 d 的荧光三维图，显示了表达差异量

4. 对照及盐胁迫的近根组织部分 DIGE 凝胶的图像比较分析

来源于 4.3 的数据用 DIA 模型进行分析，这种模型在 15.3.8 节中已有介绍。从 DeCyder 程序输出的起始数据用虚拟颜色代表，如图 15-1 所示。Cy5 标记的对照植株蛋白点为红色，Cy3 标记的盐胁迫植株的蛋白质点为绿色，两种植株都有且表达量相似的蛋白点为黄色。这样对于那些表达差异明显的蛋白质易于识别。在这个实验示例中，绝大多数的蛋白质点为黄色，说明这两个样品中蛋白表达差异不是很明显。

两种荧光波长扫描的不同图像如图 15-2 所示，这些图像可以用来进一步分析蛋白质表达差异。这两张图像看起来很相似，但是图 15-2B 上的蛋白点更多。总体蛋白质载入或者是标记效率有明显的区别，这也是这种方法的一个显著优点。软件可用于标准化这两张图像的表达量，所有的蛋白点包含在内，只有那些表达量高于或低于平均值的蛋白质点被标示为差异蛋白点。

两个图像的定量分析产生的柱状图如图 15-3 所示。正如蛋白质点检测窗口所示，在标准化和处理后，软件检测到 421 个蛋白质点，其中有 384 个没有变化的蛋白点，34 个 Cy3 标记的表达量升高的蛋白点，3 个 Cy5 标记的表达量升高的蛋白点。x 轴为这两个图片的蛋白质点的体积的 log 值的比率，左边的 y 轴为蛋白质点的频率，右边的 y 轴为代表每个蛋白点的绝对荧光强度，也就是蛋白质量。蓝色曲线表示蛋白质点频率模式柱状图，是基于红色曲线的实际柱状图生成的。

两条垂直的线表示蛋白质表达差异达 1.5 倍的 x 轴点和表达没有变化的蛋白质点，颜色使用策略和图 15-1 相似，黄色代表没有变化的蛋白点，绿色代表 Cy3 标记表达量升高的蛋白点，红色代表 Cy5 标记表达量升高的蛋白点。

在这种类型的分析中，许多蛋白点检测到表达量上有变化，但是这种变化是很微弱的以至于不易鉴定。在图 15-3 的分析中，我们运用了一个绝对荧光阈值即 10^6 荧光单元（如虚线所示）来排除这些蛋白质点。这里有 4 个蛋白质点，标记为 a～d，x 轴上在正常分布曲线之外，y 轴上超出了 10^6 荧光单元，因此这些蛋白点为 Cy3 标记的表达量超过 1.5 倍的蛋白点，这种表达量可以用来进行质谱鉴定。在柱状图里还有很多蛋白质表达差异显著，但是低于我们指定的阈值。

这 4 个强调的蛋白质代表那些响应盐胁迫并且上调表达量超过 1.5 倍的蛋白质。前 3 个蛋白点即标记为 a、b 和 c 的蛋白点突显了这种方法的缺点，它们是一个低分辨率蛋白质的一部分，这个蛋白质已经用分析软件人工划分为几个蛋白点。然而标记为 d 的蛋白点是一个高分辨率的蛋白点，荧光体积率为 1.79，如图 15-4 所示，这个蛋白点可以切下来进行质谱鉴定。

15.4 注　　释

（1）EDTA 洗液包括巯基乙醇和 EDTA，在蛋白提取过程中尽量减少蛋白质的水解，巯基乙醇可以防止二硫键的形成。

（2）为了确保蛋白质提取物的 pH 不会由于残留的 TCA 而降低，这个清洗步骤是

非常重要的。一个可靠的指示是否有残留酸存在的方法为：用标准的 SDS-PAGE 样品缓冲液来抽提另外一份 TCA/丙酮植物组织材料，如果溴酚蓝为亮黄色则表示 pH 为酸性。

（3）CyDye 荧光试剂是 Amersham Biosciences 的商业产品。有 Cy2、Cy3 和 Cy5，它们都是蓝色素的衍生物，它们在电荷及分子质量方面非常相似，但并不一样，它们具有不一样的荧光特性。

（4）这里描述的方法是最少蛋白质标记方法[8]，因此用 1∶20 的染料/蛋白质的比例标记蛋白质。绝大多数的蛋白质没有被标记。运用这种方法产生的一个问题是使用的 CyDye 染料大小的轻微差异会引起标记的及未标记的蛋白质的迁移，特别是一些小分子质量的蛋白质。这个问题可以通过运用后染技术解决，后染技术将未标记的残留蛋白质进行染色，然后基于后染的位置将蛋白质点挖出进行下一步的分析。

（5）每个样品的蛋白质浓度在每一次分开抽提中需尽可能用标准的蛋白质定量实验技术进行精确定量，并且体积也要调整到每一种荧光染料标记的蛋白质量是一样的。如果提取的蛋白质浓度太低，可以多次提取，用 TCA/丙酮沉淀，标记前再合并到一起。

（6）对于一个简单的两两比较实验，两个样品用 Cy3 和 Cy5 标记，它们的相对荧光强度可以直接比较。对于比较相对表达差异超过复本或超过一套样本的不同组分时，在相对定量统计学中有必要引入一个 Cy2 标记的内标[15]。

（7）如果实验的目的是为了运用质谱技术来鉴定差异表达的蛋白质，有必要用同体积的没有标记的蛋白质示踪荧光标记的蛋白质。对于凝胶上有 500μg 的总蛋白质，必须保证在最后的混合液中 IPG 缓冲液浓度为 0.5%～1.0%。

（8）对于两两比较实验，图像分析用 DeCyder DIA 模型分析。如果实验要重复 3 次并且用了 Cy2 标记的内标（见注释 3），图像分析可以 DeCyder BVA 模型，这种分析允许统计学评估，如 *t*-检测用来测定蛋白质表达变化的意义。

（9）荧光染料如 Sypro Ruby [31] 或 Deep Purple[32] 也可以用来后染，但是需要使用荧光兼容的蛋白点机械挖点系统。

参 考 文 献

1. O'Farrell, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250,** 4007–4021.
2. Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., et al. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21,** 1037–1053.
3. Haynes, P. A., Fripp, N., and Aebersold, R. (1998) Identification of gel separated proteins by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: comparison of methods and their limitations. *Electrophoresis* **19,** 939–945.
4. Haynes, P., Miller, I., Aebersold, R., et al. (1998) Proteins of rat serum I: establishing a reference 2-DE map by immunodetection and microbore high performance liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. *Electrophoresis* **19,** 1484–1492.

5. Cooper, B., Eckert, D., Andon, N. L., Yates, J. R., and Haynes, P. A. (2003) Investigative proteomics: identification of an unknown plant virus from infected plants using mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14,** 736–741.
6. Andon, N. L., Hollingworth, S., Koller, A., Greenland, A. J., Yates, J. R. III, and Haynes, P. A. (2002) Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2,** 1156–1168.
7. Unlu, M., Morgan, M. E., and Minden, J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18,** 2071–2077.
8. Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., et al. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **1,** 377–396.
9. Von Eggeling, F., Gawriljuk, A., Fiedler, W., et al. (2001) Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software. *Int. J. Mol. Med.* **8,** 373–377.
10. Zhou, G., Li, H., DeCamp, D., et al. (2002) 2D differential in-gel electrophoresis for the identification of esophageal scans cell cancer-specific protein markers. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 117–124.
11. Shaw, J., Rowlinson, R., Nickson, J., et al. (2003) Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* **3,** 1181–1195.
12. Hu, Y., Wang, G., Chen, G. Y., Fu, X., and Yao, S. Q. (2003) Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under metal stress by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Electrophoresis* **24,** 1458–1470.
13. Kreil, D. P., Karp, N. A., and Lilley, K. S. (2004) DNA microarray normalization methods can remove bias from differential protein expression analysis of 2D difference gel electrophoresis results. *Bioinformatics* **20,** 2026–2034.
14. Karp, N. A., Kreil, D. P., and Lilley, K. S. (2004) Determining a significant change in protein expression with DeCyder during a pair-wise comparison using two-dimensional difference gel electrophoresis. *Proteomics* **4,** 1421–1432.
15. Alban, A., David, S. O., Bjorkesten, L., et al. (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3,** 36–44.
16. Lee, J. R., Baxter, T. M., Yamaguchi, H., Wang, T. C., Goldenring, J. R., and Anderson, M. G. (2003) Differential protein analysis of spasomolytic polypeptide expressing metaplasia using laser capture microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **11,** 188–193.
17. Friedman, D. B., Hill, S., Keller, J. W., et al. (2004) Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4,** 793–811.
18. Somiari, R. I., Sullivan, A., Russell, S., et al. (2003) High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics* **3,** 1863–1873.
19. Wang, D., Jensen, R., Gendeh, G., Williams, K., and Pallavicini, M. G. (2004) Proteome and transcriptome analysis of retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells, NB4. *J. Proteome Res.* **3,** 627–635.
20. Ruepp, S. U., Tonge, R. P., Shaw, J., Wallis, N., and Pognan, F. (2002) Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol. Sci.*

65, 135–150.

21. Kleno, T. G., Leonardsen, L. R., Kjeldal, H. O., Laursen, S. M., Jensen, O. N., and Baunsgaard, D. (2004) Mechanisms of hydrazine toxicity in rat liver investigated by proteomics and multivariate data analysis. *Proteomics* **4,** 868–880.
22. Swatton, J. E., Prabakaran, S., Karp, N. A., Lilley, K. S., and Bahn, S. (2004) Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE). *Mol. Psychiatry* **9,** 128–143.
23. Van den Bergh, G., Clerens, S., Vandesande, F., and Arckens, L. (2003) Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies new differentially expressed proteins between striate cortex of kitten and adult cat. *Electrophoresis* **24,** 1471–1481.
24. Yan, J. X., Devenish, A. T., Wait, R., Stone, T., Lewis, S., and Fowler, S. (2002) Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of *Escherichia coli*. *Proteomics* **2,** 1682–1698.
25. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7,** 52–54.
26. Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., et al. (2002) Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11969–11974.
27. Thiellement, H., Zivy, M., Colas des Francs, C., Bahrman, N., and Granier, F. (1987) Two-dimensional gel electrophoresis of proteins as a tool in wheat genetics. *Biochimie* **69,** 781–787.
28. Tsugita, A., Kawakami, T., Uchiyama, Y., Kamo, M., Miyatake, N., and Nozu, Y. (1994) Separation and characterization of rice proteins. *Electrophoresis* **15,** 708–720.
29. Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., et al. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379,** 466–469.
30. Andon, N. L., Eckert, D., Yates, J. R. III, and Haynes, P. A. (2003) High-throughput functional affinity purification of mannose binding proteins from *Oryza sativa*. *Proteomics* **3,** 1270–1278.
31. Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T. H., et al. (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* **21,** 2509–2521.
32. Mackintosh, J. A., Choi, H. Y., Bae, S. H., et al. (2003) A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* **3,** 2273–2288.

第 16 章　二维凝胶的定量分析

Michel Zivy

摘要　二维电泳作为比较蛋白质组学研究的一种重要实验手段，它的应用能够方便地反映出不同生理或遗传背景下蛋白相对量的变化差异。其结果的统计意义与不同的因素紧密相关，包括从实验设计到统计测试等各种因素。在这一章中我们描述了在实验的设计和图像采集过程中应该加以考虑的不同参数，并给出了不同程序使这些量化数据标准化和根据用户自定义标准来选择可重复性蛋白质点以及在质变和量变上显著不同的蛋白质点。

关键词　蛋白质组学；统计学；量变；二维凝胶电泳

16.1　前　　言

揭示在不同生理、发育或遗传法则背景下发挥不同生物功能的蛋白质量的变化是比较蛋白质组学研究的重要内容。大多数研究基于对蛋白考马斯亮蓝或银染二维凝胶电泳的比较。尽管人类双眼对凝胶上的点有很强的分辨能力，大部分预期蛋白质的变化可以定量，但这种用于定量评估的方法仍显得相对粗糙。不能顾及到超过二或三倍强度的种类，甚至若没有可以揭示多个凝胶中有统计意义上差异的软件帮助，连简单的实验设计也不可能。目前已经开发出了用于检测、定量和匹配相应蛋白质点的几个软件。本章的主要目的不是对比不同软件产品，而是将注意力集中在不同蛋白点的图像采集和实验设计上，因为获得高质量的数据和设计出不同程序进行初步数据分析，才是我们需要关心的。尽管多数二维凝胶专用软件提供有统计分析工具，但比平常的统计软件包有更多的限制，在此不作详细解释。事实上，一旦蛋白质点已正确量化和匹配，对它们可以像分析任何其他变量一样进行分析，并且有必要用像 SAS 或 R 统计软件包提供的多重功能进行分析。

16.2　材　　料

SAS 语言编写的程序（SAS 研究所，美国北卡罗来纳州）是可用于蛋白质点变化统计分析的程序，SAS 有不同的操作系统版本。所有程序都是免费的开放源代码软件 R（http://www.r-project.org/）编程，由 Progenesis（非线性动力学，英国）制作。数据输出产生 CSV 文件，从中提取 SPOT 数据，只需稍微修改就可适用于其他软件诸如 ImageMaster（Amersham Biosciences）或 PDQuest（Bio-Rad）。

免费的开放源代码软件 ImageJ（http://rsb.info.nih.gov/ij/）可用于观察动态图像。Cluster 和 TreeView 是高级分类程序，在 http://rana.lbl.gov/eisensoftware.htm 网站上可下载。

16.3　方　　法

16.3.1　实验设计

1. 平行设计

不同凝胶之间部分蛋白质点的量变是不可控的。重复样品之间或从蛋白质样品制备到二维凝胶染色的任何步骤的生物学差异，都是这些不可控变化的原因。已经表明，批次效应（即不同系列同时运行电泳和染色的二维凝胶的变化）对二维电泳的结果影响很大，因此在实验设计中考虑这些影响很重要。多个批次时须将胶分组，只不同于分析因素，举例来说，在同一电泳槽中比较 12 个处理（每处理重复 3 次），其中 12 块凝胶可以同时运行，3 个二维系列应随后运行，每个处理应在一块凝胶的一个系列上表示。因此，一旦不受控制的变化影响到 3 个系列中的一个（如一银染比在其他稍暗），它们会以同样的方式影响到所有的处理。与此相反，如果 3 个重复中的 4 个处理在同一个电泳槽上运作，将无法解释这些处理的批次效应和真正的生物学效应之间的关系。在现实中，并不总是能够建立完全平行的设计，因为失败的二维凝胶必须进行第二次实验。不过，可以用补充批次的办法来尽可能平衡实验。

值得注意的是，批次效应的放大可以通过事后运行主成分分析（将凝胶作为观察值和将点作为变量）实现可视化。

2. 技术和生物学重复

重复对检查定量变化极为重要。它们考虑到那些不可控制的变量，而这些不可控制的变化对于评价被研究因素的效果必不可少。

当使用生物学重复时（来源于不同的植物样本），重复之间的差异是由于生物学和实验上的差异造成的。当然，当使用实验重复时（如来源于同样的蛋白质样本的不同凝胶）时，只考虑实验中的变量。因而实验重复产生的差异一定比生物学重复中产生的要小，在统计测试中从而更加显著。不过，从实验得出的结论可能只适用于该研究样本，因为不好确定差异来源：它可以由单植物的不同造成（如环境和发育的变化），或由在制备样本过程中技术的变化，以及所测试的因素所引起。相反，当运用生物学重复时，研究的因素是唯一可能产生显著差异的原因，因为只有它在对比组和鉴定组之间产生差异；因此，当所研究的处理是一个定性变量时（如干旱与对照）就必须使用生物学重复。

当研究的因素是一个连续变量（如同样试剂的不同剂量，或相同处理不同时间）时，完全没有必要为所有测试值（剂量或时间点）进行重复：统计检验（如线性回归）

将根据观测值和该预测值之间的差值计算剩余变量。不过，重复只有在以下两种情况下可以省略：①有充足的数据点（一条回归线只有 3 点是不充分的）；②蛋白质量和剂量或时间之间的关系是线性的（线性回归），或预期的线性图形是已经知道的（非线性回归）。

在某些情况下有可能使用连续数据之间的同质性（如 3 个时间点）来解释没有生物学重复的实验结果：在连续时间点的响应，它的连贯性或连续性支持变量与处理相关的假设。相反，打破连续性反应的值将被视为可能由个体差异造成。因此，连续的值实际被用来作为生物学重复。不过实际上在所研究处理的分析中，这样做将导致分辨率的丢失。

为了减小个体差异而考虑生物学变异的最好方法是在生物学重复中多取几株植物。

3. 参考凝胶

即使在定量分析时参考凝胶也不一定使用，但它一般是有用的。在大多数的二维软件包中，点匹配是基于建立一个包含所有匹配点的虚拟参考凝胶。建立这样一个参考凝胶是一个限制步骤，最好是一开始就建立一个已经包含几乎所有点的真正凝胶。可以通过运行共电泳的方法来实现，在电泳中不同的处理由等量的蛋白质代表。

16.3.2 图像采集

1. 数字化

图像数字化是定量分析的第一步。凝胶可用激光密度仪，平板扫描仪（如 Pharmacia）或 CCD 相机（如 ProXpress）扫描。

无论何种系统必须先获取传输值，也就是说，探测器接收从凝胶反射的光。传输值是探测器在凝胶存在的情况下接收信号的强度和在没有凝胶存在情况下接收信号强度之间的比率（I/I_0）。当然，当使用一个平板扫描仪时，任何使对比度增强的功能（如伽马校正）都不应被激活，因为它们会扭曲真正的传输值。传输值（范围从 0 到 1）一般编码成 16 比特位，也就是说，I/I_0 的比率转化成 0～65 735 不等的值。因此，产生的图像是一个介于 0～65 735 数值（像素）的矩阵。普遍采用灰度模式的 TIF 格式，不使用像素失真如 JPEG 格式压缩的。

2. 图像分辨率

分辨率（每长度单位多少像素）越高，小点将被检测和量化得越好。不过分辨率在检测有重叠点的群体中也是一个制约因素。

如果强度峰值之间没有“波谷”，多数二维软件包是不能探测同一组中的多个点的。因此，点检测的准确性取决于能否发现这些“波谷”，而这又取决于代表两点之间强度变量像素的数量。约 24cm×20cm 的凝胶，一般用每像素 100μm 的分辨率，近似于 300dpi（每像素 84.7μm）。这个值实际上是一种折衷的选择，因为两个因素限制了图像分辨率：①图像采集速度：当众多的凝胶必须同一天扫描时，扫描凝胶所花时间成为限

制因素；②图像文件的大小：用分辨率为 100μm/像素和 16 位数字化对约 24cm×20cm 凝胶扫描，产生的文件为 10～14Mb。图像文件越大，二维套装软件检测、量化并匹配点所需要的时间越长（见注释 1）。

3. 动态图像

在图像采集过程中，应尽可能充分使用 65 736 灰度级。视扫描仪的类型，可调整曝光时间、光圈大小、使用过滤镜与否。凝胶图像不应含有白色表面（100%传输）：如果背景未检出，背景水平面上的小点也可能将不会被检出。

图像也不应该包含黑区域（0%传输），因为比阈值更黑的所有点将被编码成相同的值。

免费软件 ImageJ 可以用来寻找这些饱和值的可能区域。它还能检查动态图像，即图像上最小和最大值之间的差值。图像动态应最大化：当然精确的量化取决于图像采集中使用的灰度水平。如果用几百灰度水平处理 65 000 以上的图片无疑是不恰当的。

当使用相机时，光可以产生光晕：即边缘区域的图像比中央区域要黑。有的图像采集系统（如 ProXpress、Perkin）设计时本身已顾及光晕。当然，这种现象也可以通过背景消除法消除。

4. 传输数据转化为光密度

传输的数据必须转换成光密度（当然荧光染色不能做这种转换）。在大多数的二维数据包中不需要用到这个。蛋白质浓度与光密度呈线性相关，而非传输值。光密度（OD）和传输值之间的关系如下：$OD=-\log(I/I_0)$。

由于这种关系不是直线，一个给定的传输增加值与不同的 OD 增加量相对应，这依赖于传输数值的原始值。只要使转换的光密度与点量和蛋白质量成线性关系。如果某一特定蛋白质分别来源于 A 和 B 两个不同的样本，且 B＝A＋X，那么 $OD_B=OD_{(A+X)}=OD_A+OD_X$，其结果 OD 是相加关系，这对于传输值是不正确的，在背景减除之前必须先做这种转换（图 16-1）。

一般地，可以通过扫描柯达条带（Kodak strip）转换成 OD。二维软件数据包含有一种工具来记录与传输数据相应的已知 OD 和计算调整曲线。值得注意的是，转换必须顾及 OD 和传输值之间的自然对数的关系，否则线性回归是没有用的。

16.3.3　点量的均一化

正如在 1. 中已经讨论过的，大部分的变化点是与凝胶效应相关的：在蛋白质上样过程中，在二维电泳中可能的蛋白质沉淀和在染色过程中的不可控变化都有可能影响凝胶整体强度。这种变化或多或少会影响某一特定凝胶上所有的点，所以均一化的目的是纠正这些普遍的差异。因此，均一化应该在蛋白点转化为 OD 值和背景消除以后进行（见注释 2）。

1. 蛋白点均一化的定义

进行点检测的区域由用户决定。一般情况下蛋白点的均一化要在同一个区域中进

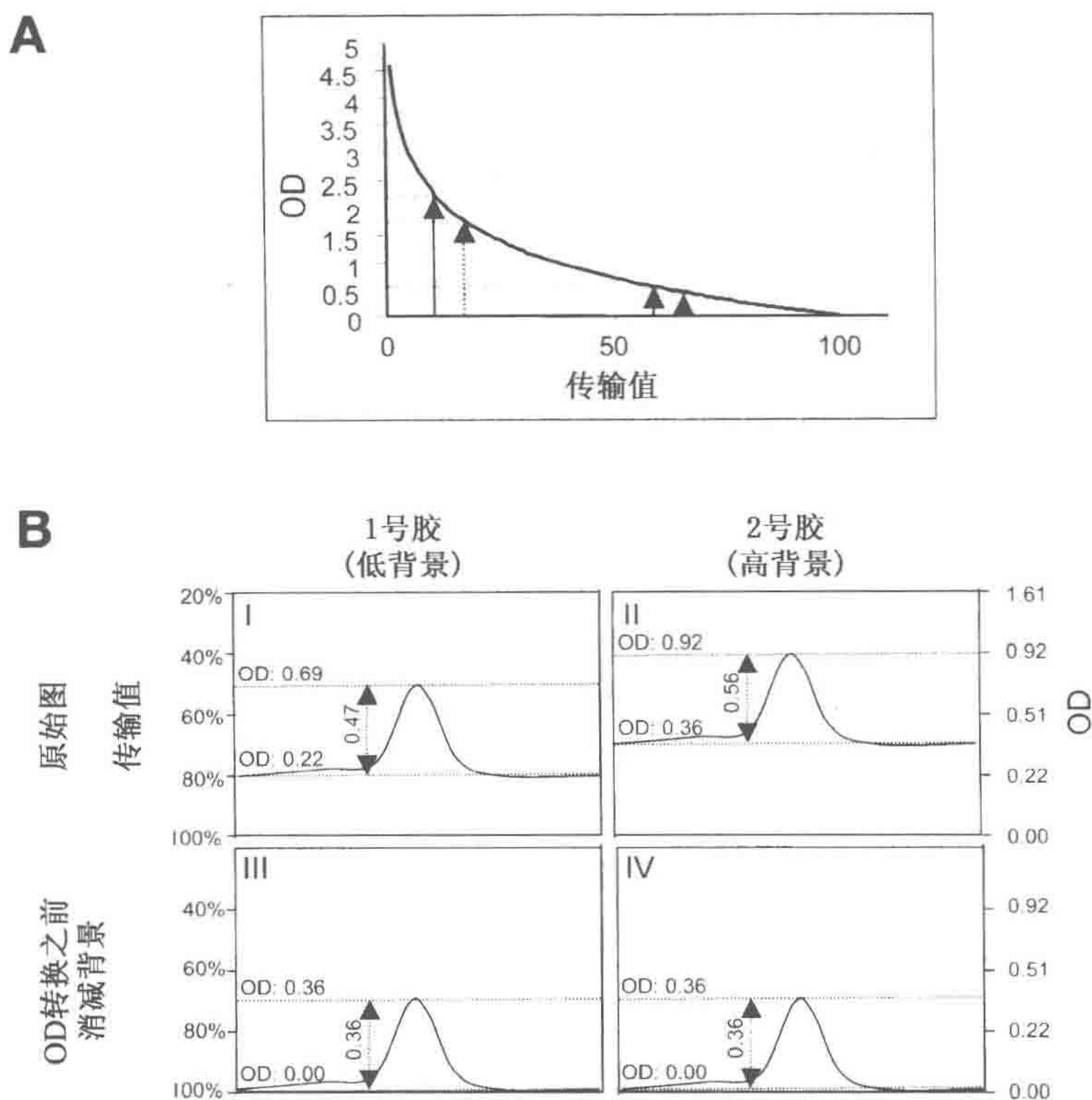


图 16-1　从传输值到光密度的图像数据转换。(A) 由于传输率和光密度之间的对数关系，给定的低传输值（黑色点箭头）对应一个高的 OD 值。(B) 模拟点一维剖面。根据传输数据，点的高度（最高值减去背景）在图像 1 和图像 2 中是相同的（30%）。由于两个图像的背景水平不同，30%的传输分别对应图像 1 和图像 2 的（I，II）OD 单位 0.47 和 0.56。因此两块凝胶上的蛋白质含量不同，实际值是转换成 OD 之后再消除背景得出。如果在转换为 OD 之前被减去背景，即如果在传输单位（第 III、第 IV）上减除时，在两块凝胶上就会出现相同的错误的 0.36OD 单位值

行。在所有凝胶中确定一个相同的区域很重要，因为这种广泛的均一化模式是基于这个区域中所有蛋白质点的总量。由于凝胶-凝胶变化（不完整的凝胶，因各种原因难以定义的区域），并不总是能够确定所有的凝胶中蛋白点检测的相同区域。那么，这时最好定义另一个区域作点的均一化。其实，即使感兴趣的同一区域被限定作点检测，而为了计算均一化界定更小的区域将更加实用，凝胶上大多数可变区可抛弃。蛋白点体积的均一化是依照用户自定义区域中点的总量而定的，可以用二维软件包简单程序化。从二维软件包中输出的数据包括 X、Y、非均一化的量、在每个凝胶上的每个检测点优化的匹配数目（即参考数）。这些数据很容易在一般的二维软件包输出（如通过从 Progenesis 的测量窗口输出数据）。

“firstgel. csv”是一个文本文件，其中第一行包含列标题，下面的行包含点的数目、匹配点的数目、X、Y 和在第一向凝胶上所有检测点的非均一化的量。图 16-2 显示的是用 SAS 语言编写的程序，根据用户自定义区域所有点的总量使其归一化，并产生一个单独的固定表格，其中每个点是一个变量（一列），每一个凝胶是一行（一个观察值）。虽然图 16-2 没有表示，但这种方法容易与另一个方法配合使用。举例来说，点的总量计算可以限制在所有凝胶上出现的点（见 16. 3. 5 节）。计算也可以只限于特异的一系列点。但是，最终选定作归一化的点数不应该太少：数目越少，归一化越不稳定。

如图 16-2 程序所示，由于有许多的注释，所以看起来非常复杂，其实他们是相对明确而简单的。正如分析定性和定量的变化有不同的方法，归一化也有不同的方法。可以用最普通的统计数据包进行编辑，方法上比二维数据包自带的有限统计工具更加便捷和先进。

```
/* normalization according to the sum of spot volumes in a user-defined rectangle */
libname dir2d '~zivy/demo2d'; /* (see Note 7) */
/* loading data into the table named "firstgel" (see Note 8) */
data firstgel;
infile 'firstgel.csv' firstobs=2;
/* (see Note 9) */
input spot match$ x y vol;
/* (see Note 10) */
/* Step 1: selecting spots according to their position */
data selspot; set firstgel;
xmin=500; xmax=1700;        /* change user-defined coordinates here */
ymin=300; ymax=1500;
/* selection of all spots in the region delimited by xmin, xmax, ymin and ymax: */
if x>xmin and x<xmax and y>ymin and y<ymax; /* (see Note 11) */

/* Step 2: compute the sum of the volumes of selected spots.
result in volsum in table selsum: */
proc means noprint data=selspot;
var vol;
output out=selsum sum=volsum;
/* Drop useless variables */
data selsum; set selsum;
a=1;
drop _type_ _freq_;
title 'sum of selected spot volumes ';
proc print data=selsum;
run;
data firstgel; set firstgel;
a=1;

/* Step 3: normalize. (see Notes 12 and 13)
Notice that all firstgel's matched spots are kept and normalized, while the scaling factor was computed only on
the basis of a subset of its spots */
data firstgel;
merge firstgel selsum;
by a;
constant=10000;
vol=(vol/volsum)*constant;
/* unmatched spots were used for normalization but they are useless for gel to gel comparisons: */
if match="." then delete;
```

```
/* step 4 : transpose the table, to put the volumes of all spots of the gel in one line */
data firstgel ;
set firstgel ;
drop spot x y constant xmin xmax ymin ymax volsum a;
/* (see Note 14) */
if length(match)=1 then match='s000'||match;
if length(match)=2 then match='s00'||match;
if length(match)=3 then match='s0'||match;
if length(match)=4 then match='s'||match;
proc transpose out=gel1;
id match;
data gel1;
set gel1;
gelname='firstgelname'; /* replace with the real gel name */
proc print data=gel1;

/* End of the program for one gel.
The same program will be run for  all gels of the experiment, with adequate coordinates for delimiting selected
spots and gel names, producing tables gel1, gel2...geln. These tables should be concatenated, to produce a table
containing one line per gel: */
data gels;
set gel1 gel2 gel3 geln;
/* additional information relative to the gels and the samples can now be merged with this single table: let
samples be a table containing the variables gelname, batch, genotype, treatment */
proc sort data=samples; by gelname;
proc sort data=gels; by gelname;
data dir2d.alldata;
merge gels sample;
by gelname;
```

图 16-2　根据用户自定义的矩形上点的总量编写的归一化程序

2. 其他点的归一化方法

另一种点的归一化方法是基于在参考凝胶与所研究凝胶同一区域上点的体积比：vol_{ref}/vol_{gel}，要计算参考凝胶和研究凝胶上所有的匹配点。均一化是由凝胶上的所有点的体积与相应比值的平均值（或中值）乘积组成。由于没有将全部点计算，该方法的准确性并不取决于均一化区域的精确界定。当然即使它的重复性不是很好，我们仍然可以使用感兴趣的经典区域。因为它是基于在两块凝胶上匹配的点（即在均一化的凝胶和在参考凝胶上），均一化涉及的点数多于在所有凝胶上出现的点数，因为随着实验中凝胶数量的增加，凝胶上点的数量会明显下降。

这种方法在理论上也优于同一区域上相对应的所有点的归一化方法，因为它对于一个处理的特异性点没有偏差。它可以通过计算在一个特定的范围内点的体积比来提高其准确性。事实上，可以不考虑很微弱的点，因为小体积的变化可以引起大比率的变化，而且非常大的点也应排除在外，因为这些大点的近饱和值缺少线性关系。

在此方法中未匹配的点是没有用的，只有包含所有凝胶上所有匹配点的原始量和匹配数目的一个表将被输出。程序如图 16-3 所示，从 CSV 文件中提取的数据来源于 Progenesis 软件的“比较窗口”。第一列包含匹配的名字，接下来的列包含不同凝胶上点的非归一化量值。值得注意的是，如果对由二维软件所提出的归一化方法满意的话，这种定量数据输出的方式也是最方便的。同时输出的文件还可以用于可重复性点和定性变化点的选取（见 16.3.5）。

```
/* Program for spot normalization according to the match ratio */

/* Each line of the file "quantif.dat" contains the matchname and the volume values of the spot in the different
gels of the experiment (there are 24 gels in this example). There are as many lines as spots.
Volume values will be given to variables x1 to x24 in table temp. */
data temp;
a=1;
infile 'quantif.dat' firstobs=2; /* change firstobs according to the number of lines to skip at the beginning of the
file */
input spot$ x1-x24;

/* Let us compute the ratio for all selected spots. Only not too small and not too large spots are selected. */
data select;
set temp;
large=300; /* change large and small according to your data */
small=50;
ref=x1; /* change ref according to the chosen reference gel */
array sp{*} x1--x24;
do i=1 to dim(sp);
  if sp{i}>small and sp{i}<large then sp{i}=ref/sp{i};
    else sp{i}=.;
end;
 /* Let us have a look to the distribution of the ratio in each gel: */
 proc gchart;
 vbar x2/midpoints=(0.1 to 10 by 0.2);
 vbar x3/midpoints=(0.1 to 10 by 0.2);
 vbar x4/midpoints=(0.1 to 10 by 0.2);
 /*...*/

 proc means  data=select;
 var x1-x24;
 output out=mmm median=d1-d24;

 proc print data=mmm;
 run;

 data mmm;
 set mmm;
 a=1;

 /* Normalization */
 data tot;
 merge temp mmm;
 by a;
 array sp{*} x1—x24;
 array fact{*} d1—d24;
 do i=1 to dim(sp);
   sp{i}=sp{i}*fact{i};
 end;
 drop a i mq _type_ _freq_ d1--d21;
 run;

 /* spotnames are changed as in Figure 2 */
 data tot; set tot;
 if length(spot)=1 then spot='s000'||spot;
 if length(spot)=2 then spot='s00'||spot;
 if length(spot)=3 then spot='s0'||spot;
 if length(spot)=4 then spot='s'||spot;

 /* the table is transposed to get a table with spots as columns and gels as lines */
 proc transpose out=tt;
 id spot;

 /* table tt is now ready to be merged with a table containing the gels and information related to the samples (gels
 in the 2 tables must be in the same order): */
 data dir2d.alldata;
 merge gels tt;
```

图 16-3　按照匹配率使点区域归一化的程序

Burstin 等[1]建立了另一种点均一化方法。它是基于主成分分析法，适用于当所研究的参数变量相对于残差较小时，或者是这种变异只涉及少数点时。这里不作进一步介绍。

16.3.4　相对强度和相对量的线性关系

分析蛋白质（丰度）含量与测量点的体积间的关系是十分有趣的。一种做法是，比较载有相同样本的一系列蛋白质含量的凝胶。不过，在真正的比较中，由于点的量是归一化的，这并不能给出一个正确的量化估计。实际上，人们不能从载有相同样本不同含量的凝胶上归一化点的量，这是由于归一化将消除整体凝胶效应，而这种效应是由蛋白质上样差异所造成的。

更好的方法是使用两种包含特定点的不同样本（如感兴趣的样本和另一来自不同的物种或器官的样本），并且准备不同比例的混合物，如从 1∶9 到 9∶1，但总蛋白质的量不变。从这些不同混合物和两个纯样本获得的二维凝胶可以像通常情况一样实现均一化，能够计算出对于感兴趣样本的特异点的回归，正如在混合样本中各样品的已知比例一样。Avid 等[2]使用这种方法，对在正常的实验中相同条件下点的量与蛋白浓度的线性关系进行研究。如果反应是线性的，即可对不十分显著的差异蛋白浓度进行测定。

16.3.5　质变

质变，即点变量的存在与缺失，这比定量变量更容易确定。然而，有时它的界定也会比较困难，至少在处理大规模实验时，会有一定量的数据缺失。

重复点不能在所有的凝胶都出现，因为根据定义是不可能检测到重复的质变点。因此，最好用一致性来处理，同时考虑到这样一个事实，即蛋白质点可以持续性地出现或缺失。最严格的一致性标准是认为一个蛋白质点必须在某一给定组中所有重复中都存在（处理组、基因型等），并在另一个“缺失”组中的所有重复中都缺失。但是，这个标准对于许多凝胶过于严格，因为实验中存在可能的意外（如凝胶染色比其他的浅、凝胶的破损等）。

16.3.6　量变

定量蛋白质组学分析的目标差异可能很大，从全局分析，其兴趣在于确定蛋白质变化的主要根源，确定与特殊处理相应的为数不多的蛋白质点。

定量变化可以用来分析蛋白质之间的关系，如确定核调控蛋白质的种类。一般情况，等级分类用在以下这种情况：在不同的实验条件根据蛋白质总量将它们聚类并可视化。通过“cluster”程序可以做到聚类的可视化。

主成分分析（PCA），以点作为变量，以样本作为观察值，它能根据变量所代表蛋白质点的主要变异量使不同样本的分布可视化（见第 17 章）。PCA 也可以自动侦测异常凝胶，如所研究凝胶上的点却散落在其他凝胶上（见注释 3）。

定量变化的另一种做法是寻找与实验（如处理、基因型）可控因素或实验期间的其他因素（如激素剂量）明显相关的功能蛋白质。像 PCA 这样的全局性分析中，并不希望专门侦测到显著变化点，因为它们不一定需要很多，而其变化相对于大多数点的变化

有高度特异性。当检测点存在单一或多因素显著变异时，一般选择方差分析的方法。当两个以上的处理进行对比，这时最好使用方差分析，而不是直接运行 t-检验，因为它能更好地计算剩余方差估计式（见注释 4）。

```
/* determination of reproducible spots and identification of qualitative variations */

/* read the spot names and their value in the 24 gels, put these values in variables x1 to x24 in table temp */
data temp;
infile 'quantif.dat' firstobs=3;
input spot$ x1-x24;

/* transpose the matrix of data like in step 4 of figure 2 */
data temp; set temp;
if length(spot)=1 then spot='s000'||spot;
if length(spot)=2 then spot='s00'||spot;
if length(spot)=3 then spot='s0'||spot;
if length(spot)=4 then spot='s'||spot;
proc transpose out=tt;
id spot;

/* Merge the table of spot volumes "tt" with a table containing the characteristics of the samples ("gels"). In this
example, gels contains two variables: gelname and geno (for genotype). Gels in the table "gels" must be in the
same order than in the table "tt". */
data total;
merge gels tt;
drop _name_;

/* counting the frequency of a spot in each genotype */
proc sort data=total;
by geno;
proc means noprint data=total;
by geno;
output out=pa n=;
*proc print data=mmm;
/* Now the table mmm contains as many lines as there is different genotypes and the value at the ncol column
and the ngeno line is the number of times the ncolth spot was present in the ngenoth genotype. A reproducible
spot should not necessarily be present in all gels because this would preclude the identification of spots showing
qualitative variation.
Thus it is preferable to deal with the idea of consistency, which takes into account the fact that a spot can be
consistently present or absent in the different groups or genotypes. The most severe criterion of consistency is
that a spot must be present in all the replicates of a genotype to be considered as present, and absent in all
replicates to be considered as absent. However when the experiment contains numerous gels this criterion is too
severe, because of all possible accidents in the experiment (e.g. a gel less stained then others, a problem of
detection on another one, etc...).
*/
/* selecting consistent spots */
data reprod;
set pa;
okmin=0; /* replace with your criterion for absence: to be considered as reproducibly absent a spot must be
detected at most okmin times in the same genotype */
okmax=0; /* replace with your criterion for presence: to be considered as reproducibly present, a spot must be
missed at most okmax times in the same genotype */
array sp{*} s0001--s3254; /* replace with the names of the first and the last spot */
/* a consistent spot is either consistently present (value=1) or consistently absent (value=0). */
do i=1 to dim(sp);
  if sp{i}<=okmin then sp{i}=0;
    else if sp{i}>=_freq_-okmax then sp{i}=1;
      else sp{i}=.;
end;
*proc print;

/* compute the number of genotypes where the spots where considered as consistent */
proc means noprint data=reprod;
```

```
var s0001--s3254; /* replace with the names of the first and the last spot */
output out=mmm2 n=;
/* compute the number of genotypes where the spots where considered as present */
proc means noprint data=reprod;
var s0001--s3254; /* replace with the names of the first and the last spot */
output out=mmm3 sum=;

/* let us transpose both results and merge them */
proc transpose data=mmm2 out=mt2;
proc transpose data=mmm3 out=mt3;

data mt4;
merge mt2 (rename= (col1=nbcons)) mt3 (rename=(col1=nbpres));

/* A spot should be considered as globally reproducible when it is consistently present or absent in all genotypes.
However, when there are numerous genotypes, it would be too bad to consider as non reproducible a spot that is
consistent in almost all genotypes except one or two. */

data cons nocons;
okcons=6; /* replace with the number of genotypes in which a spot must be consistent to be declared as
reproducible */
set mt4;
if nbcons>=okcons and nbpres>0 then output cons;
          else output nocons;

proc print data=cons;
title "consistent spots";
run;
/* let us create a permanent table (rep.reprod) that contains only consistent spots */
data nocons;
set nocons;
if _name_='_TYPE_' then delete;
data _NULL_;
set nocons;
file 'noreprod.out';
put _name_;
data rep.reprod;
set totprov;
drop
/* let us create a permanent table (rep.reprod) that contains only consistent spots */
data nocons;
set nocons;
if _name_='_TYPE_' then delete;
data _NULL_;
set nocons;
file 'noreprod.out';
put _name_;
data rep.reprod;
set totprov;
drop
%include 'noreprod.out';
;

*proc print data=rep.reprod;
title "reduct";
run;

/* the spots showing qualitative variation are those for which the frequency of presence is smaller than the
frequency of consistent: */
data quali;
set cons;
if nbpres<nbcons;

title « qualitative variations »;
proc print data=quali;
run;
```

```
/* Let us have a look on bar graphs of qualitatively variable spots
Of course the list of qualitatively variable spots can also be exported and used in Excel for making other graphs
or in a 2D software for display */
data _null_;
set quali;
file 'quali.out';
put "%look(" _name_ ");";
run;

%macro look(spot);
proc gchart data=rep.reprod;
hbar gt / type=mean sumvar=&spot freqlabel='Effectif'
      meanlabel='Volume moyen' clm=50 noframe
      midpoints='P1/SS' 'P1/WW' 'P2/SS' 'P2/WW' '151/SS' '151/WW' '245/SS' '245/WW' 'mix/ss'; /* replace
with the values of genotype */
%mend look;

%include 'quali.out';

run;
```

图 16-4　显示的程序，考虑了不同用户自定义确定的一致点和质变点的标准

经过方差分析后，根据具体的生物学问题可以使用不同的比较方法。如 Dunnet 测试适用于同一控制条件下不同的处理方法进行对比，Duncan 或 Student-Newman-Keuls 测试适用于所有处理间的比较（见注释 5）。线性回归适用于计算点与连续变量（如激素的剂量）之间的关系。图 16-5 显示了选择所有点的 SAS 编程程序，这些点显示了在两因素方差分析中显著的变化及因素间的相互作用（见注释 6）。

一般情况下，0.05 或 0.01 是统计检验中常用的显著性水平。即当数据中的变化有 5%或 1%的概率时，这变化被认为是显著性变化。换言之，显著性水平是一个假阳性检测的概率。因此，如果 0.01 显著性水平用于 1000 个点时，可以肯定的是它们中约有 10 个是假阳性。方法之一，考虑用比较的数目分割显著性水平（Bonferroni 校正）。在目前情况下，这将导致 10^{-5}的显著性水平。这样检测到的全部假阳性概率是 1000 点区域存在 0.01 个假阳性。这是一个保守的方法，但它降低了灵敏性，因为显著性水平为 10^{-5}时，变异将非常大。使用此方法也可能丢失许多真的点。

```
/* analysis of variance */

/* take the table of reproducible spots, that was created by the program of figure 4. */
data bid;
set rep.reprod;

/* analysis of variance. In this example there are 2 factors (genotype and treatment), that are discrete variable.
They are declared in the "class" command. The interaction between the 2 factors is also declared in the model.
Statistical results are stored in the table ggg. The analysis is carried out on all spots contained in the table "bid".
*/
proc glm noprint outstat=ggg;
class geno treat;
model s0002--s3254=geno treat geno*treat/ss3; /* s0002 and s3254 are the first and last spots in rep.reprod */

/* let us arrange the results to get a single table containing the level of significance of the various factors */
data ggeno;
set ggg;
if _source_='geno';
proc sort; by _name_;
```

```
data gtreat;
set ggg;
if _source_='treat';
proc sort; by _name_;

data ginter;
set ggg;
if _source_='geno*treat';
proc sort; by _name_;
/* in the permanent table resanov, variables cgeno, ctreat and cinter will contain "***", " **", "  *", "   ", or "  ."
according to the level of significance of respectively the genotype, the treatment and the interaction. */
data rep.resanov;
merge ggeno (rename=(prob=pgeno) keep=_name_ prob)
    gtreat (rename=(prob=ptreat) keep=_name_ prob)
    ginter (rename=(prob=pinter) keep=_name_ prob);
by _name_;
array proba{3} pgeno ptreat pinter;
array cproba{3} $ cgeno ctreat cinter;
do i=1 to 3;
  if proba[i}=. then cproba{i}='  .';
    else if proba{i}<0.001 then cproba{i}='***';
      else if proba{i}<0.01 then cproba{i}=' **';
        else if proba{i}<0.05 then cproba{i}='  *';
          else cproba{i}='   ';
end;
proc print;
var _name_ cgeno ctreat cinter;

/* let us select significant spots and draw bar graphs */
data signif;
set rep.lanov;
if (substr(cgeno,2,2)='**'
  or substr(ctreat,2,2)='**' or substr(cinter,2,2)='**');
proc print;
var _name_ cgeno ctreat cinter;

data _null_;
set signif;
file 'signif.out';
put "%look(" _name_ ");";

data bid;
set rep.reprod;
gt=trim(geno)||'/'||treat;

%macro look(spot);
proc gchart;
hbar gt / type=mean sumvar=&spot freqlabel='Effectif'
       meanlabel='Volume moyen' clm=50 noframe
       midpoints='P1/SS' 'P1/WW' 'P2/SS' 'P2/WW' '151/SS' '151/WW'
              '245/SS' '245/WW' 'mix/ss'; /* replace with the values of genotype/treatment combinations */

%mend look;
%include 'signif.out';
```

图 16-5　方差分析程序

在做多重比较时，Benjamini 和 Hochberg[3] 提出了错误发现率（FDR）的方法。这种方法的原理是要允许几个百分点（如 5%或 1%）的检测变化是假阳性。而 Bonferroni 校正的做法是保持 1/1000 个假阳性点的风险在 1%。而 FDR 方法是允许阳性检测的 1%错误，这种方法不是很保守，但比 Bonferroni 校正更灵敏。这是一个处于完全没有

校正（所有点测试在 1%）和“过度”校正（Bonferroni 校正）之间的折衷方案。图 16-6显示了依照 FDR 方法选择显著点的 SAS 程序。

```
/* FDR method */
/* Assume that an analysis of variance was run as in figure 5.
We will use the FDR method for the genotype effect. We just need the name of the spots and the p-values
associated to the genotype effect. */
data pvalues;
set rep.resanov;
keep _name_ pgeno;
/* get rid of missing data */
if pgeno=. then delete;
a=1;

/* number of spots */
proc means noprint;
output out=mmm;
data mmm;set mmm;
if _stat_='N';
a=1;
keep _freq_ a;
data pvalues;
merge pvalues mmm; by a;


proc sort data=pvalues;
by pvalue;

data prov;
set pvalues;
alpha=0.05; /* change the threshold here */
j=_n_;
b=j*alpha/_freq_;
c=pvalue-b;
if c<0;
run;

proc sort; by descending j ;
title 'Benjamini threshold p-value';
data prov;
set prov;
if _n_=1;
a=1;

proc print;
var pvalue;
run;

title 'Significant spots';
data pvalues;
merge pvalues prov(rename=(pvalue=threshold)); by a;
if pvalue<=threshold;
proc print;
var spot pvalue;
```

图 16-6　依照 FDR 方法选择显著点的程序

16.4 注　　释

(1) 当使用迷你胶时，分辨率必须增加，因为上面的点一般比大凝胶的要小。

(2) 在点编辑互动式的步骤中，一般可能会删掉点。应该注意到，有些均一化的方法是基于点的总量；因此要避免删去太多的点，还有对所有凝胶处理时，一定要采用同样的方式。

(3) 聚类和 PCA 方法是不接受数据缺失的。数据缺失必须更换；否则即使包含一个数据缺失整个观察值将被从数据库中删除。取代缺失数据的方法之一是以 0 替代它们。不过，这并不一定是最保守的做法。举例来说，如果有很多零（即许多质的变化），它们将代表大部分的变化，其风险是这些质的变化最终将掩盖其他点的定量变化。其他的统计工具，如相关性分析[4]，适用于全局性的定性分析。在主成分分析中，为审慎起见应以点的均值替换缺失的数据。在 SAS 程序中使用的“标准”程序将很容易实现此操作。

(4) 必须指出，方差分析不会顾及点的缺失。例如，如果在处理 A 中一个点缺失，但存在于处理组 B 和 C 中，如果其在处理组 B 和 C 之间是不变量，方差分析不会得出该点是显著性变化，定性变量必须用定性分析进行独立检验。将缺失值用 0 取代，不是一个好的办法，因为这将改变残差的计算，使比较结果不可信。

(5) 试图控制比率的相对增加或减少来选择点，不是一个好的想法，原因如下所述：①这种方法选定的一些点，将不会产生有实际意义的统计学结果，因为这种选择方法没有考虑到残差的变异程度；同样的原因，也可能没有选中一些有实际意义的点。②选择有时是任意或随意的，一些点的选出与否不依赖于选择。③此方法倾向于减少点，因为对照组和控制组通过因素 0.5 减少的点之间的差异比它们通过因素 2 增加的点之间的差异小 2 倍。但是，一旦根据适当的测试方法，有统计意义的点被选定，就可以选择显示其中最大变异的点。

(6) 点的平均值与其变量之间往往存在着某种关系，小点比大点的标准偏差小，这就不适合作方差分析。这个问题可通过用点体积的对数代替它本身的体积来克服[1]。

以下的注意事项，请参阅图 16-2。

(7) SAS 表单将被存储在定义为“dir2d”的目录中。

(8)“/ *”和“ * /”分别代表注释的开始和结束。因此，可以复制整个代码，其中包括注释。

(9) 美元符号必须在字母变量之后出现。Match 是数字，但在这个例程中，它作为一个字符串声明更容易些，因为它在随后的程序中会被用来作为变量名称。

(10) 数据缺失，即未被发现的点，在 CSV 文件中必须用句点来代表。绝不能用 0 代表。用 0 来代替句点，将使定量和定性的变化的计算发生错误。

(11) 如果＜condition＞：条件为真，那么只保留观察值。

(12) firstgel 表每一点包含一行，而表 sumfstgel 只包含一行。我们需要合并两个表，因为点的容量是在 firstgel 表，而 sumgel 存在于 sumfstgl 表。通过一个变量名为

“a” 进行表合并，无论 firstgel 表中的所有行还是 sumfstgel 表中的单一行，都将被赋予相同的值，sumfstgel 表中的单一行将被 firstgel 表中的每一行所复制。

（13）用户可以改变常数，这不会影响统计测试结果（当然，同一常数值必须用于所有凝胶）。

（14）以字母字符开始的匹配号码转换成字符串的时候，这种方式下仍然允许数字排序。

参考文献

1. Burstin J., Zivy, M., de Vienne, D., and Damerval, C. (1993) Analysis of scaling methods to minimize the experimental variations in two-dimensional electrophoresis quantitative data. Application to the comparison of maize inbred lines. *Electrophoresis* **14,** 1067–1073.
2. David J. L., Zivy, M., Cardin, M. L., and Brabant, P. (1997) Protein evolution in dynamically managed populations of wheat: adaptative responses to macro-environmental conditions. *Theor. Appl. Genet.* **95,** 932–941.
3. Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc.* B, **57,** 289–300.
4. Marquès, K., Sarazin, B., Chané-Favre, L., Zivy, M., and Thiellement, H. (2001) Comparative proteomics to establish genetic relationships in the Brassicaceae family. *Proteomics* **1,** 1457–1462.

第17章　蛋白质组数据的多元分析

Kare Engkilde，Susanne Jacobsen，Ib Sϕndergaard

摘要　我们提供了关于蛋白质组学数据的多元分析背景，并且还提供了不同数据包数据转换的方法。这项技术可以用来解决包含大量数据的生物学及生物化学方面的问题。多元分析包括2D胶的数字化、图像处理软件分析、数据的转换、多元数据分析、结果的解释，根据这些多元分析，最终解决生物学的问题。

关键词　多元数据分析；蛋白质组学；双相电泳；二维凝胶；主成分分析；偏小二乘回归；图像处理

17.1　前　　言

很明显，在实验中能提供大量信息的某项技术如双相电泳，是不适合用常规的统计学方法来分析的。如果一定要用常规的统计学方法，通常含有大量蛋白质点的一些2D凝胶就没有足够的自由度来分析。只有在研究蛋白质的上调或下调和有足够的样品时，才可以运用常规的统计学方法来分析。在正常情况下（有限的2D凝胶和大量的蛋白质点），想要快速找到感兴趣的蛋白质点，一般采用多元分析方法[1-4]。因此我们提出了一个新的涉及工作流程的多元分析方法，即产生假设的（hypothesis generating）而不是假设驱使的（hypothesis driven）。这样，我们就能灵活自由地开发数据而不产生偏差，而且最终能运用生物学知识建立相关的假设。

产生假设的分析是多元分析背后的整个概念的一个自然结果。传统的统计学分析往往是先建立一个假设，然后用实验来证明或推翻这个假设，也即是我们所谓的演绎分析。相对于传统的统计学方法，多元分析是一种归纳分析。因此假设是在一系列的计算实验之后建立的。

多元分析以统计学和数学方法为基础，包括一些可视变量的数据分析及一些具有许多重要变化形式的体系研究[5]。

在这里我们介绍主成分分析（principal component analysis，PCA）及偏小二乘回归（partial least squares regression，PLSR）。PCA用以获得数据总貌以及数据之间的联系。PCA分析可以用来找出数据库里的隐藏结构。PCA提供了低维的数据方案，即将多维导向低维。在此过程中，有可能找出外在的观察结果、相似观察结果的归类及其他数据结构的分析。

这项技术是以主要成分及直角坐标轴的数学技术为基础的。一个主要成分往往是指一个潜在的变量。这个变量不能直接测出但是可以通过和一套输入变量线性组合分析出

来[5]。数据矩阵 X 可以分成结构和误差两部分。结构部分包含得分矩阵 T 和转置加载矩阵 P^T，误差部分记为 E [6]。主成分分析方法的数学方程式如下：

$$X = T \cdot P^T + E$$

PCA 可以将大量的可能有关联的变量转化为少量没有关联的变量或主要成分。与初始变量线性组合的主成分坐标轴可以替换初始坐标轴。

数据的结构是用横坐标代表样品，纵坐标代表变量。在本文中，横坐标代表凝胶，纵坐标代表蛋白点（点的强度）。主成分与样品间的关系称为分值，与变量间的关系称为负载。第一主成分包含数据库中尽可能多的变量，接下来的主成分包含尽可能多的剩余变量。

PLS 用来关联校准数据的 y 矩阵（响应数据，response data）和定义仪器输出的 x 矩阵（描述性数据，descriptor data）。在本文中，y 代表实验样品，x 代表蛋白点。

可以通过回归模型（regression modeling）将两套数据进行关联加以校准：$Y=X \cdot B$。

B 是指包含 b-回归参数（b-regression vector）的矩阵，这种参数表示预测变量和响应变量之间的联系。

用多元数据分析 2D 凝胶的主要步骤如下所述。

（1）确定研究方案后建立蛋白的 2D 凝胶。

（2）用具备透射模式扫描的扫描仪使凝胶数字化。

（3）用数据分析软件分析数字化的 2D 凝胶。

（4）产生一张蛋白点列表。

（5）将表格数据输入到多元分析软件进行分析。

（6）做出关于蛋白点数据的 PCA 图。

（7）阐述分值及下载策略。

（8）返回到生物学问题。

（9）用 PLSR 分析样品蛋白响应变量。

17.2 材　　料

（1）具备透射扫描功能的扫描仪。

（2）图像分析软件。

（3）Excel 程序。

（4）多元数据分析的软件。

17.2.1 多元数据分析软件

界面友好和结果图形化、易于解释清楚的独立软件有：

（1）Camo 的矫正器（可以下载试用版本）（http://www.camo.com）。

（2）Umetrics 的 SIMCA-P（可以下载样本）（http://www.umetrics.com），软件在 MATLAB 计算环境下运行。

（3）Eigenvector 的 PLS 工具箱（http://eigenvector.com），该软件可以运

行 PCA。

(4) Provalis Research 的 MVSP (可以下载样本) (http://www. simstat. com)。

(5) Addinsoft 的 XLSTAT (加入了 Excel) (http://www. xlstat. com)。

(6) MINITAB Inc. 的 MINITAB (http://www. minitab. com)。

(7) Infometrix 的 Pirouette (http://www. infometrix. com)。

(8) Applied Chemometrics 的 Chemometrics 工具箱 (在 MATLAB 环境下工作) (http://www. chemometrics. com)。

(9) UmBio 的 Evince (http://www. umbio. com)。

(10) Extract Information 的 Extract (http://www. extractinformation. com)。

17.2.2 2D 凝胶电泳图像分析软件

(1) Amersham Biosciences 的 ImageMaster (http://www. amershambiosciences. com)。

(2) Bio-Rad Laboratories 的 PDQuest (http://www. bio-rad. com)。

(3) Compugen 的 Z3 (http://www. 2dgels. com)。

(4) Nonlinear Dynamics 的 Phoretix 2D 及 Progenesis (http://www. nonlinear. com)。

17.3 方　　法

用 Progenesis、Excel 和 The Unscrambler 对 2D 凝胶进行多元分析。

17.3.1 确定研究方案后建立蛋白的 2D 凝胶

在本章节中不再阐述，但要确定染色方法以便进行凝胶的定量分析 (见注释 1)。

17.3.2 用具备透射模式扫描的扫描仪使凝胶数字化

在本节中不再阐述，但要确保用高色素、高分辨率扫描图片 (见注释 2) 并且在图像处理软件中用正确的格式保存图片 (见注释 3)。

17.3.3 用数据分析软件分析数字化的 2D 凝胶

2D 凝胶数字化后 (图 17-1)，用图像分析软件 Progenesis 确认蛋白质点，和参考凝胶上的蛋白质点进行匹配分析。可以自动选择参考凝胶，也可选择一个特异 2D 凝胶作为参考凝胶，不能匹配的蛋白质点可归到参考凝胶中。

17.3.4 生成蛋白质点列表

蛋白质点检测后，可以生成相匹配的蛋白质数值列表，通常这是体积数据。这个列表可以在 Progenesis 软件的比较窗口 (Comparison Window) 找到。这个列表 (表 17-1) 还可以通过 Edit 菜单中的 Copy to Excel 输出到 Excel 中。标记为 1 时表示蛋白质点存在，标记为 0 时表示蛋白质点不存在。这个二元列表在某些情况下非常有用 (见注释 4)。另一个非常重要的一点就是要同时对这些蛋白质点进行标记 (见注释 5)，

否则数据录入到 Excel 中，将会产生这样或那样的问题（见注释 6）。

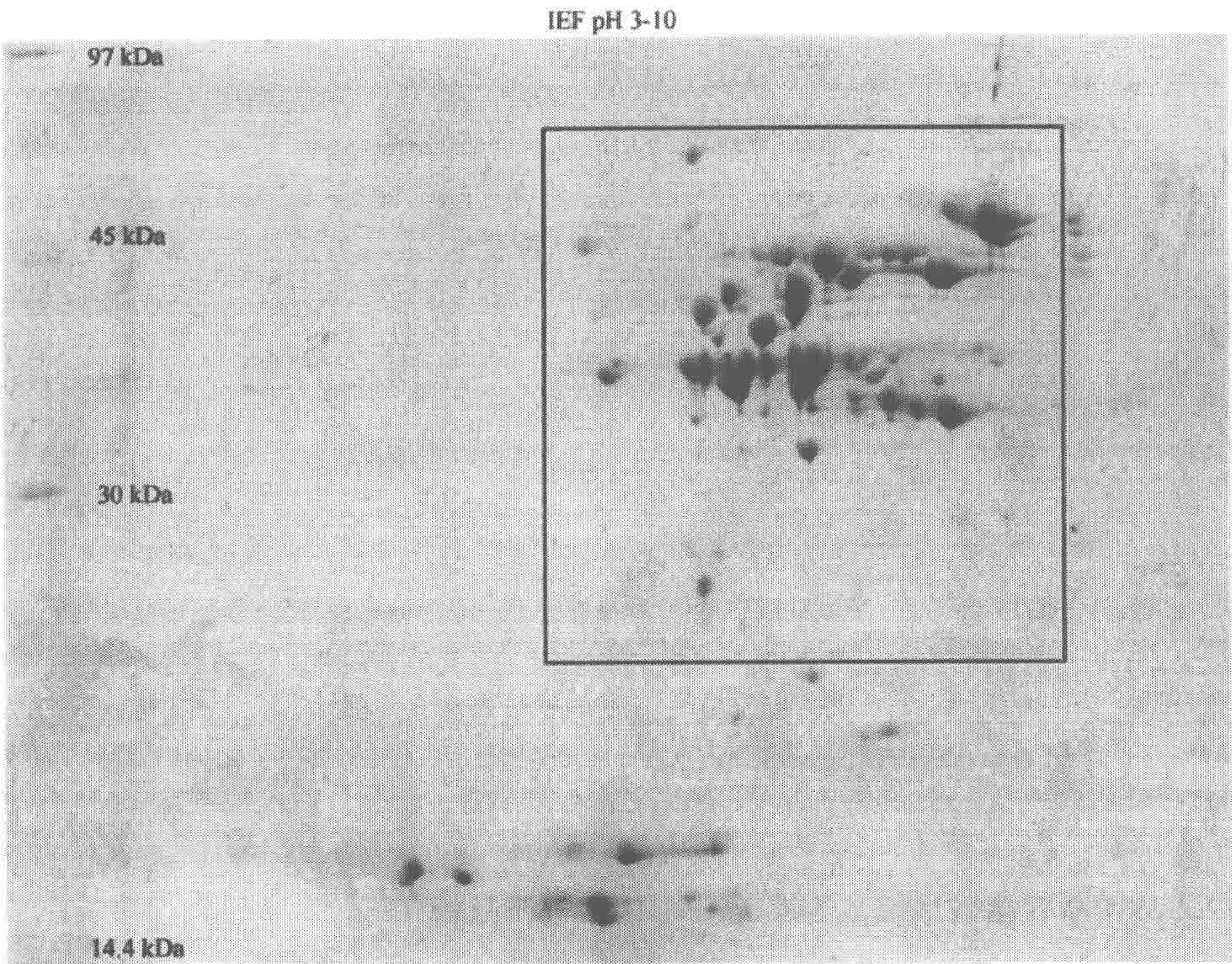


图 17-1　70%的乙醇抽提液抽提硬质小麦面粉的 2D 凝胶电泳图
凝胶用 CBB 染色，方框里的蛋白质和来源于另外两种硬质
小麦面粉的相应蛋白质将进行比较分析，每个品种做两次重复

表 17-1　6 块凝胶的部分蛋白质点的标准化体积

Ref. spot[a]	面粉 1		面粉 2		面粉 3	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
8	0.512	0.425	0.325	0.338	0.000	0.000
19	8.427	7.403	7.539	8.491	6.451	7.107
24	2.643	3.165	2.192	2.583	1.960	1.562
27	0.570	0.593	0.391	0.492	0.000	0.000
28	4.768	4.894	5.549	6.361	4.438	4.753
34	2.248	3.261	0.000	0.788	1.172	0.953
42	7.490	8.922	6.772	8.116	5.529	6.162
45	1.316	1.242	1.690	1.716	1.177	0.972
46	0.606	0.244	0.910	0.724	0.058	0.170
47	0.459	0.000	0.371	0.377	0.335	0.299
48	0.596	0.815	0.000	0.000	3.164	0.000
49	1.805	1.756	1.196	1.438	2.035	2.135
55	0.799	0.746	1.273	1.244	1.338	1.226

续表

Ref. spot[a]	面粉 1		面粉 2		面粉 3	
	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2	样品 1	样品 2
57	1.404	1.529	0.981	1.116	1.694	1.714
64	1.361	1.015	0.457	0.308	0.247	0.493
65	0.370	0.401	0.267	0.320	0.106	0.232
66	0.273	0.347	0.206	0.209	0.114	0.093
67	0.480	0.443	0.350	0.458	0.415	0.264
68	0.351	0.267	0.152	0.178	0.000	0.000
69	0.052	0.038	0.000	0.000	0.115	0.097
71	1.351	1.143	1.146	1.123	0.919	0.843
72	3.949	2.799	2.573	3.122	3.439	3.297
73	3.398	4.326	4.042	3.559	2.186	2.016
77	2.325	2.070	1.600	1.957	1.277	1.945
86	0.315	0.311	0.753	0.988	0.644	0.709
88	1.105	0.000	0.986	1.013	0.000	0.000
97	0.507	0.529	1.554	0.453	0.467	1.691

a. Ref. spot 代表 2D 分析软件中不同的蛋白质点，标准化体积是蛋白质点的体积除以总体积乘以 100 所得，也可以采用别的体积。

17.3.5　将表格数据输入到多元分析软件进行分析

（1）在数据录入到 The Unscrambler 之前，要将默认值标记为 0（见注释 7），因为 The Unscrambler 不能处理默认数值。

（2）在 The Unscrambler 中，蛋白质列表通过 File 菜单中的 Import submenu 输入到 The Unscrambler 中。在 Import 窗口选中 Excel spreadsheet 和 Spot list，然后选择 Import（见注释 8）。

（3）在出现的 Import Worksheet 窗口，选择所需要的工作项目，并且填写有关的区域。Sample Names 填写指定的蛋白质点，Variable Names 填写凝胶名称。

（4）列表输入后，数据矩阵必须进行转置以确保样品的名称对应研究目标，蛋白质点对应变量。在 Modify 的子菜单 Transform 中有这种转置功能。

17.3.6　做出关于蛋白质点列表的 PCA 图

现在可以进行 PCA 分析。在 Unscrambler 中，PCA 可以通过 Task 菜单中的 PCA 程序完成。在 PCA 窗口有不同的选项。通常 PCA 运行时，变量会自行定标（autoscaling），数据也会中心化（centering）。自行定标等同于除以标准偏差（SDev）的权重（weights）（Weights with 1/SDev）。通过除以标准偏差（SDev），共变异数矩阵（covariance matrix）变成了关联矩阵（correlation matrix），因此 PCA 是在关联矩阵而不是在共变异数矩阵上完成的。

1. 验证方法

接下来是验证方法的选择，选择的依据主要是样品的数量和建立另一套数据的可能性。如果这套数据包括很多凝胶，首选的验证方法是测试集（test set）法，其次是交叉验证（cross-validation）方法。

（1）测试集验证基于两套不同的数据，一个用来 PCA 的校准（校准集）和创建模型，另一个是用来测试 PCA 校准的计算模型（测试集/验证集）。

测试集需要几个条件。首先，和校准集一样，所有的样品必须是来自同一个群体，取样条件必须和校准集的取样条件一样。此外，这两个数据集必须具有代表性。由于两个数据集有可能很相似，因此不能简单地将一个大的数据集划分为两个数据集。只有两个数据集的不同部分才可以作为取样方差，即来源于同一目标群体的独立的样品的方差[6]。校准集必须足够大以便校准一个模型，测试集也必须足够大以便测试这个模型。通常我们没有足够的样品来做测试集检验，因此就必须做杠杆验证或交叉验证。

（2）当样品少但又都很重要时可以进行杠杆验证（leverage validation）。由于杠杆验证是检验整个数据集，之后也用来验证测试正确的数据集，因此杠杆验证通常得出很好的结果。但我们不推荐使用杠杆验证。

（3）交叉验证用于中到大的数据集。数据集进行划分，每个区域省去，子模型（不包含区域的数据集）用来进行校准，划分的区域用来检测模型。每个区域都必须这样操作。区域大小和结构（随机的、系统的、手工的）将因数据集类型的不同而不同。每个区域占总的数据集的 25％，也就意味着有 4 个子模型要进行计算和测试。对于小一点的数据集，经常使用仅一个样品的区域，这就叫做全交叉验证也就意味着在校准时省去一个样品，省去的样品用来检测。全交叉验证是有多少样品就需要构建多少个子模型。因为每一次只能省去一个样品，每一次省去的样品用来测试模型，当全交叉验证检验一个平衡的数据集时往往能得到一个很好的验证结果[6]。

（4）在 Unscrambler 中，可以选择可变选项（见注释 9）。

图 17-2 示例 PCA 分析。

17.3.7　分值阐述及分值图

（1）主成分（PC）和原始的变量为线性关系，包含了数据结构信息。第一主成分涵盖了绝大部分的信息，越高级位的主成分涵盖的信息越少，PC 也被叫做潜在变量或得分向量。

（2）分值图（score plot）是两个或三个主成分的样品位置的图，因此样品越相似，得分越接近。一开始人们用簇来阐释 Score Plot，即具有共同特征的样品为一个簇，从而我们可以得到样品及区别于样品的变量的信息。此外，还可以发现离群样品，即一些和绝大部分样品不同的样品。由于离群样品可能是我们感兴趣的样品，可能还可以帮助我们发现分析时的错误或者数据收集的错误（即可以剔除的数据），所以我们还是有必要分析离群样品的。

（3）Score Plot 应该和同样主成分的 Loading Plot 中的信息一起分析，这可以帮助

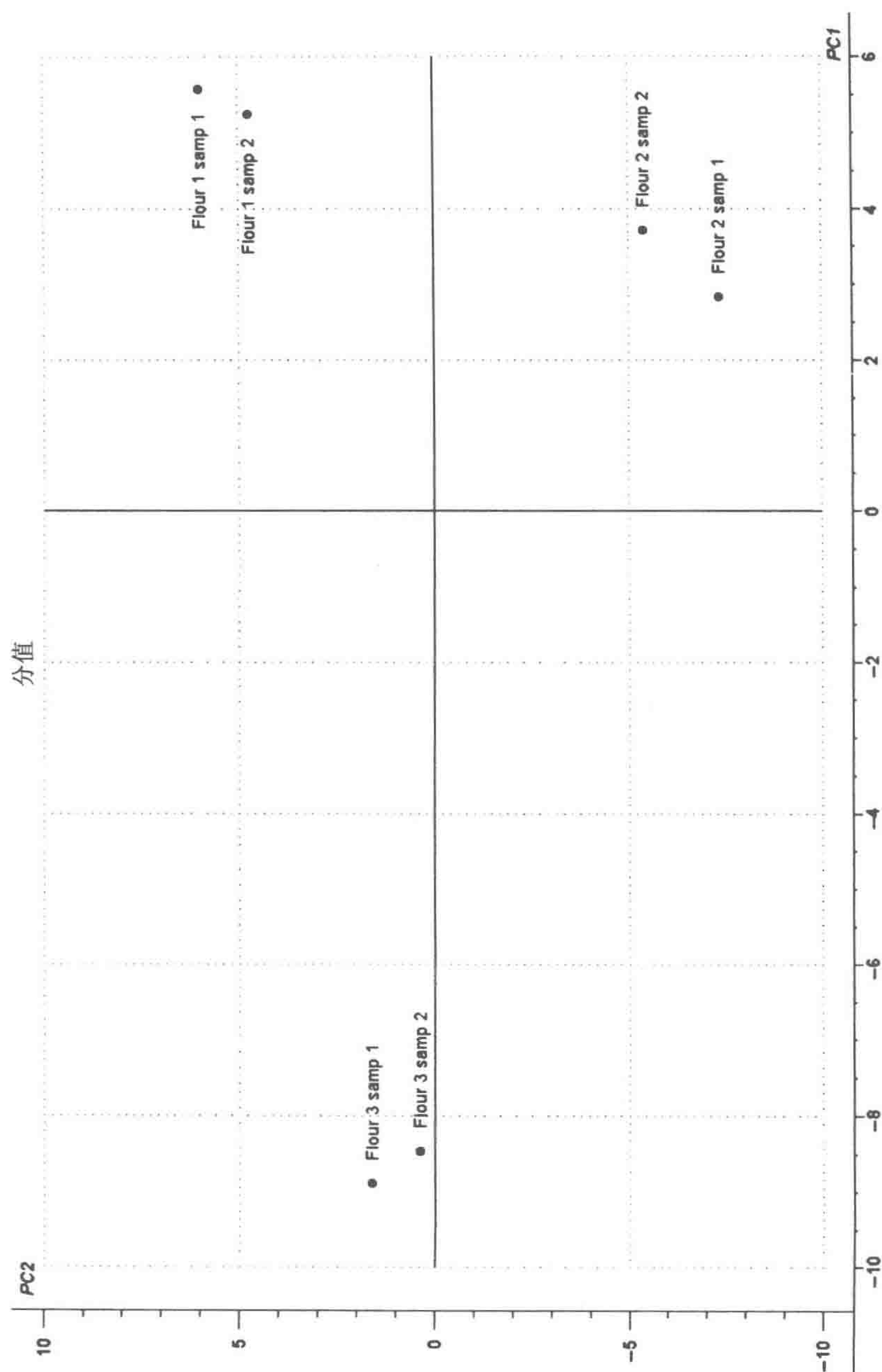


图 17-2　第一主成分和第二主成分的主成分分析后的分值图

很明显第一主成分将品种 3 分出来，第二主成分将品种 1 和品种 2 分开。有时候为了找到感兴趣的划分，需要研究更高级的主成分

图 17-3　PC1 和 PC2 的 Loading 图

Loading 和 Score 图都很重要，因为 Loading 图显示了变量

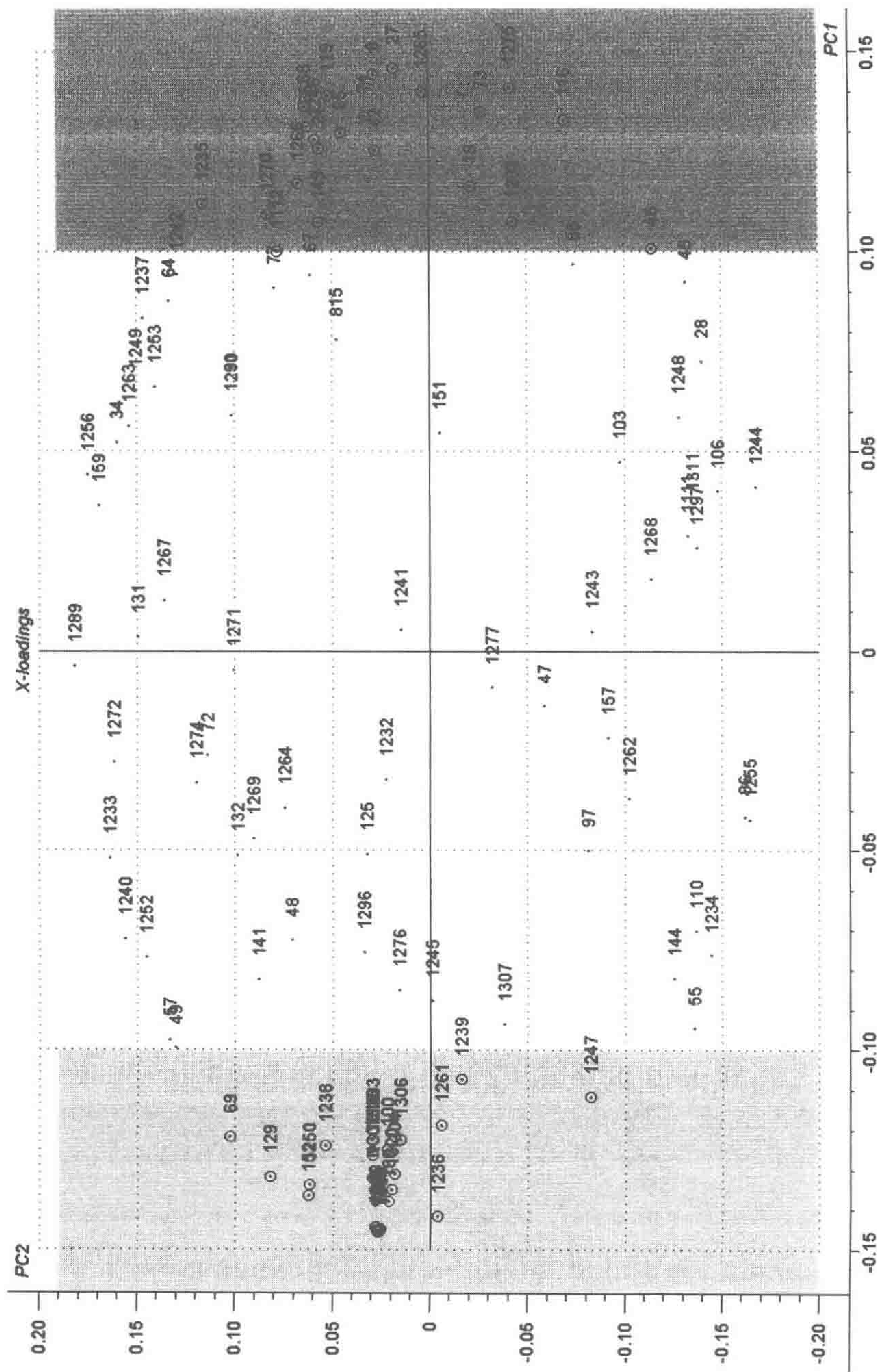


图 17-4　感兴趣的区域 Loading 图的放大显示

这块区域和从品种 1、品种 2 划分出来的品种 3 相关，左边阴影部分和品种 3 相关，右边阴影部分和品种 1、品种 2 正相关

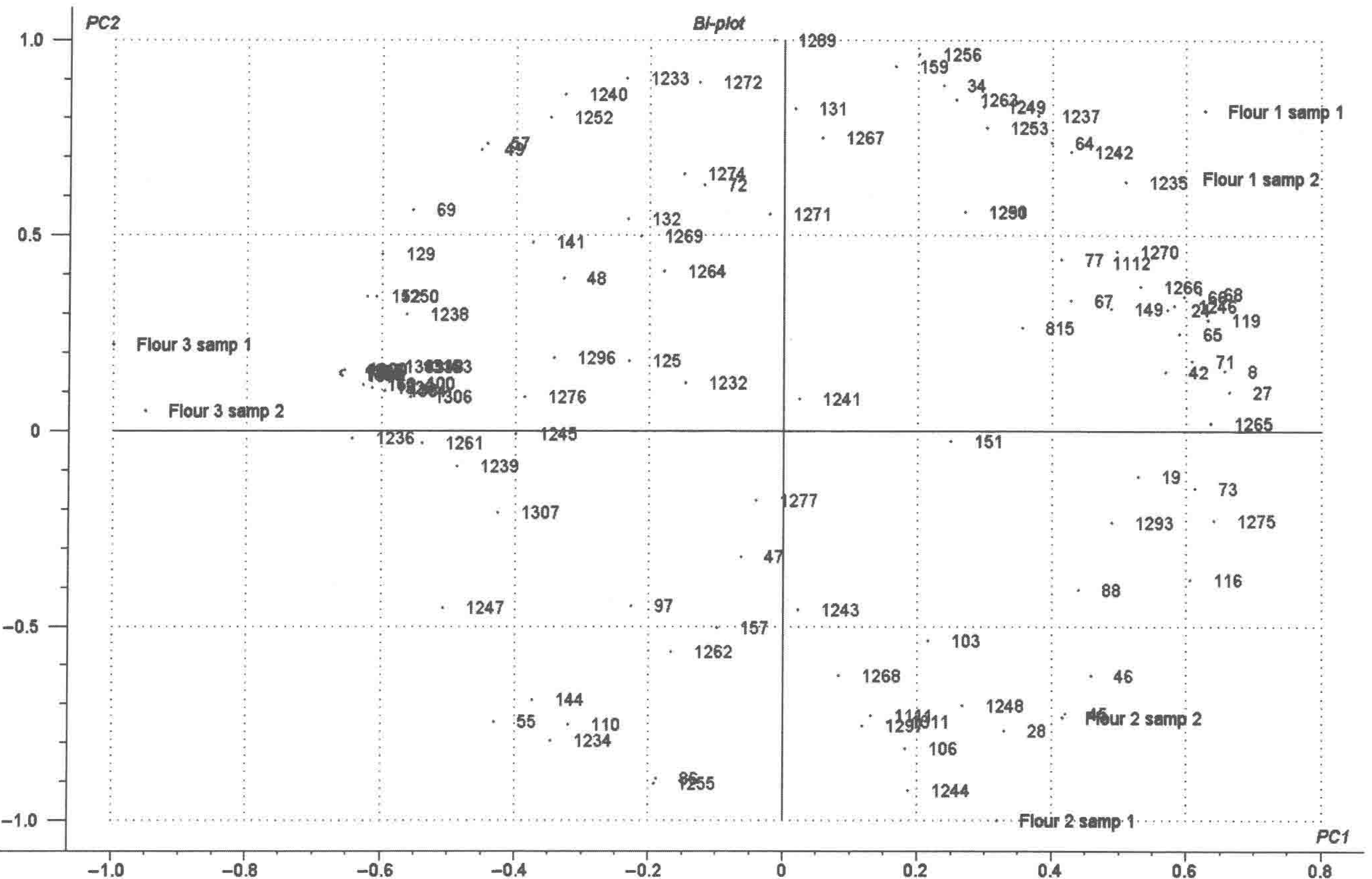


图 17-5　2D 的 Loading 图和 Score 图相结合的双标图

这种图显示了变量和样品的一一对应关系，此图告诉了我们哪个点对应哪个品种

我们确定变量，这些变量即是样品的不同点，这个可以在 Score Plot 中观察到。Loading Plot（图 17-3）从不同的角度描绘数据。每个变量有一个 PC 值，这个不仅反映了由多少个变量贡献这个 PC，还反映了这个 PC 多大程度上考虑到变量的变化。

（4）阐述 Loading Plot 从高分值的变量开始，这可以帮助分析一个特别的 PC 的意义（图 17-4）。同样分值越高的两个变量相关性越高。由于 Loading 是变量和 PC 的角度的余弦值，因此这个数值是在 [−1：+1] 之间的任意数值。高分值的变量，相同方面正相关，相反方面负相关。为了帮助分析，可以做双标图，它是 Scores 和 Loadings 的散点图（图 17-5）。

17.3.8 回归生物学分析

一旦用 Score 图阐明了样品分布，用 Loading 图阐明了变量（导致样品分布），就要回到样品的生物学或生物化学问题上了。在 2D 凝胶电泳中，蛋白点是变量，也即意味着通过这种分析可以指出哪些蛋白质点负责该 2D 凝胶的一些分布（图 17-6）。研究者由此可以提出一个假设来解释这种分布。这也叫做探索性数据分析（exploratory data analysis），这是一种非常有效的蛋白质组学分析方法。

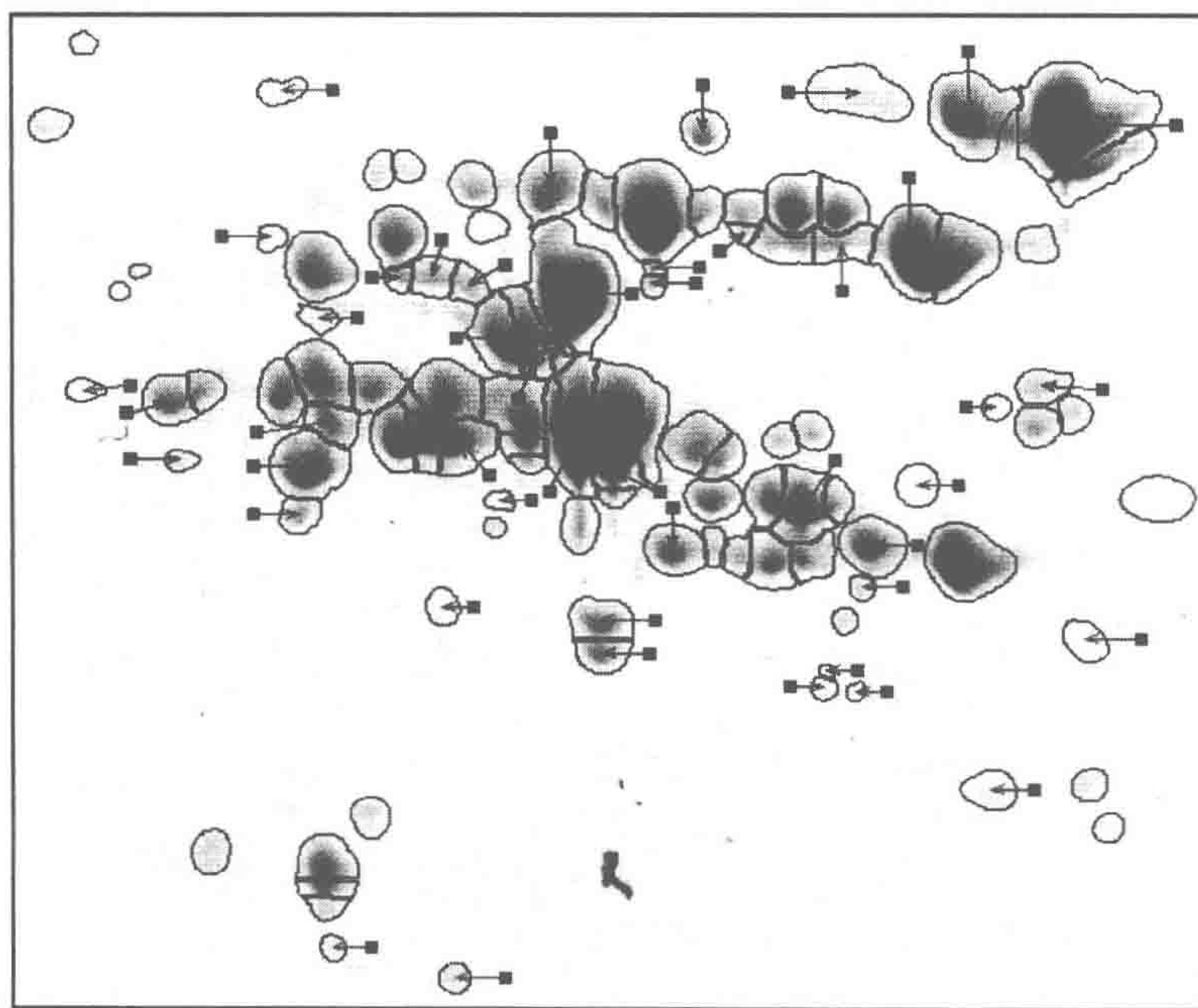


图 17-6 根据参考凝胶，可以从图 17-2～图 17-4 的信息解释 PCA 信息的生物相关性
参考凝胶是一种由二维图像分析软件生成的人工凝胶图像。在这种情况下，所有无法匹配的点已被添加到凝胶中，这意味着所有各种凝胶的点均出现在这种人工凝胶上。这使得它很适合概括实验结果。箭头表示基于 Loading 图感兴趣的点。浅灰色箭头指向的点，是特指基于 Loading 图的品种 3，黑色箭头指向的点特指基于 Loading 图的品种 1 和品种 2

17.3.9　用偏小二乘回归分析和蛋白样品相关联的相应变量

偏小二乘回归（PLS-R）通过回归方法将两套数据矩阵（X 和 Y）相关联，是一种监管方法（supervised method）。PLS-R 的原理和 PCA 相似，通过多维空间的数据点找到能够解释大多数变化的最直接线性关系[6]。PLS-R 的目标是为了预测另一个数据表的理想特征，需用一个数据表建立一个线性模型。因此，PCA 是为了找到一个数据表（X 矩阵）中的隐含信息。PLS-R 是用来检测两个数据表（X 矩阵和 Y 矩阵）的关系[6]。X 矩阵为 $(N\times K)$，Y 矩阵为 $(N\times J)$，N 为样品，K、J、X、Y 分别为变量[5]。

PLS-R 是通过操作 PCA 的 X 矩阵和 Y 矩阵起作用的，这两个矩阵相互依存。

类似 PCA[5]，X-变量是根据 X-装载 P 和 X-余值 E 通过有关模型与 X-分值 T 进行关联的[5]：

$$X-\overline{X}=\mathrm{T}\times\mathrm{P}'+\mathrm{E}$$

相类似，Y-变量是根据 Y-装载 Q 和 Y-余值 F 通过有关模型与 X-分值 T 进行关联的[5]：

$$Y-\overline{Y}=\mathrm{T}\times\mathrm{Q}'+\mathrm{F}$$

Y-变量可直接由 X-变量通过回归系数矩阵（regression coefficient matrix）B 获得[5]：

$$Y=\mathrm{B}_0+\mathrm{X}+\mathrm{B}+\mathrm{F}$$

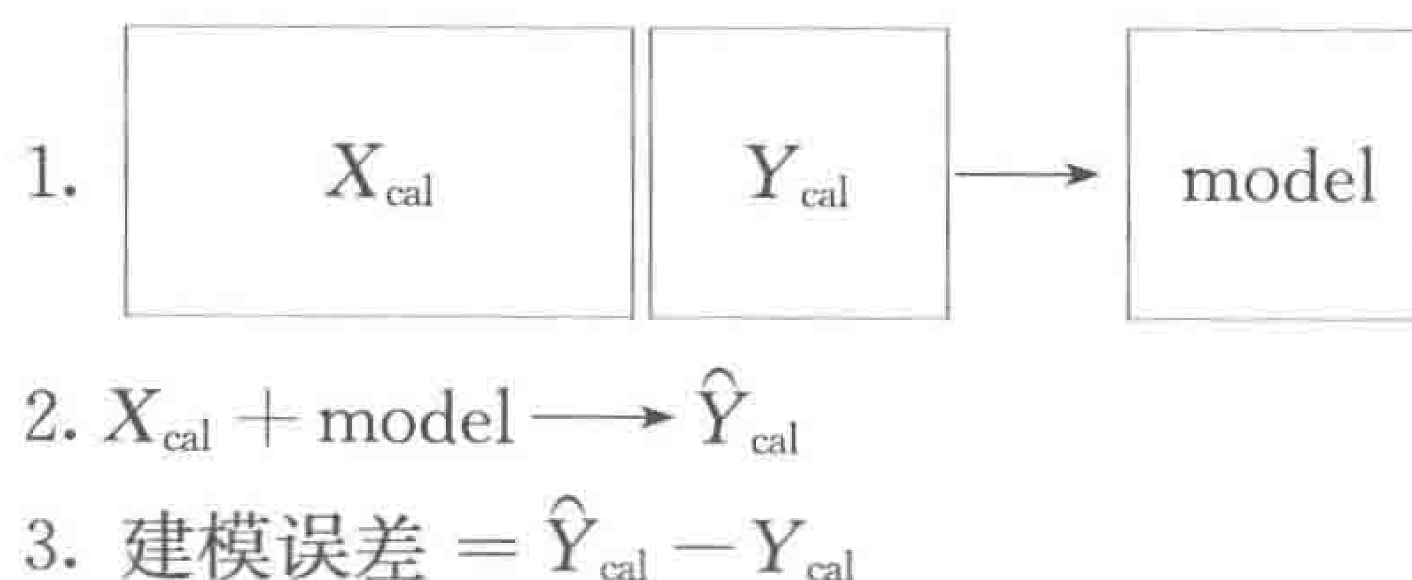
将上述一系列方程进行结合分析，就能解析获得结果。

PLS-R 的校验

PLS-R 校验的意义是通过两个参数体现的：一个是余值校验 Y-变量（residualvalidation Y-variance，RVYV），表示所测的 Y-变量（Y_{ref}）与预测的 Y-变量（Y_{pref}）的差异。不同模型的差异可以用 RVYV 的均方根表示（RMSE）[6]。

$$\mathrm{RVYV}=\frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_{\mathrm{perd}}-Y_{\mathrm{tef}})^2}{n}\qquad \mathrm{RMSE}=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_{\mathrm{perd}}-Y_{\mathrm{tef}})^2}{n}}$$

X-数据用于建立模型。X 值插入模型中可以预测 Y 值。建模误差（modeling error）为 Y-预测与 Y-数据的差值[6]。



2. $X_{\mathrm{cal}}+\mathrm{model}\longrightarrow\hat{Y}_{\mathrm{cal}}$

3. 建模误差 $=\hat{Y}_{\mathrm{cal}}-Y_{\mathrm{cal}}$

偏差是预测样品与校准样品相似程度的表达方式。预测样品与校准样品相似时，偏差值就小。偏差高，预测的 Y-值就不可信[6]。

最后一个重要的参数是相关系数（correlation coefficient，r），作为界定 X 和 Y 之间的相关性，相关公式如下：

$$r = \frac{x\text{ 和 }y\text{ 之间的协方差}}{S_{\text{dev}}(x) + S_{\text{dev}}(y)}$$

$$r = \frac{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})(Y_i - \overline{Y})}{n-1}}{\left(\sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}\right)\left(\sqrt{\dfrac{\sum_{i=1}^{n}(X_i - \overline{X})^2}{n-1}}\right)}$$

相关性是两个变量之间线性关系的量度。当值为 1 时表明变量之间的线性关系存在，值为 0 时意味着变量之间没有线性相关性。

17.4 注　　释

(1) 如果要依据蛋白质点的大小来分析凝胶，最好选择考马斯亮蓝（CBB）和银染的方法进行染色，这两种方法可以确保蛋白质点的大小和蛋白质的量为线性关系。

(2) 在做好 2D 凝胶后，就要将其数字化。为了确保图像分析软件能够较为精确地划分相连的蛋白质点，尽可能用高色深数字化凝胶。因此最好用 16 位灰度色深和250～300 的分辨率。

(3) 确保 2D 凝胶的图片保存格式和分析软件兼容。

(4) 通过建立一个二元蛋白质点列表来分析量的变化，这个列表包括 1 和 0。1 和 0 分别代表蛋白质点的有和无，正常大小的蛋白质点才用来做二元蛋白质点列表，可以用 Excel 里的 IF 程序来做这个列表。

(5) 很重要的一点是，为了确保匹配的蛋白质点具有相同的称号，在做蛋白质点列表前要同时指定蛋白质点。在 Progenesis 里可通过选择 Edit 菜单里的 Synchronize Spot Numbers 完成。

(6) 重要的是要确保在 Excel 里按序号来阐述蛋白质点列表值。否则，多元数据分析软件要正确输入蛋白质点列表时就会出现问题。有必要用句点作为小数点分隔符。

(7) 用 Excel 的 Edit 菜单的 Replace 选项，将缺失值用 0 取代。

(8) 经验告诉我们，通过把单元格命名为数据，指定蛋白质点和胶的名字，将使数据矩阵从 Excel 输入到 The Unscrambler 更容易一些。这是因为在输入后，这些名字会再出现在 The Unscrambler 中。在 Excel 里，选好要命名的单元格，选择公式栏左侧的 Name，就可以命名单元格；还可以通过 Define Name 的对话框来命名单元格，通过选择 Insert 菜单中的 Name 子菜单下的 Define 来完成。

(9) 在 The Unscrambler 里，有一个可变选项 Uncertainty Test（刀切法，jack-knife），可以用来选择感兴趣的选项。

参 考 文 献

1. Gottlieb, D. M., Schultz, J., Bruun, S. W., Jacobsen, S., and Søndergaard, I. (2004) Multivariate approaches in plant science. *Phytochemistry* **65,** 1531–1548.
2. Jessen, F., Lametsch, R., Bendixen, E., Kjærsgård, I. V. H., and Jørgensen, B. M. (2002) Extracting information from two-dimensional electrophoresis gels by partial least squares regression. *Proteomics* **2,** 32–35.
3. Radzikowski, L., Nešić, L., Hansen, H. B., Jacobsen, S., and Søndergaard, I. (2002) Comparison of ethanol-soluble proteins from different rye (*Secale cereale*) varieties by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **23,** 4157–4166.
4. Schultz, J., Gottlieb, D. M., Petersen, M., Nešić, L., Jacobsen, S., and Søndergaard, I. (2004) Explorative data analysis of 2-D electrophoresis gels. *Electrophoresis* **25,** 502–511.
5. Martens, H. and Martens, M. (2001) *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction.* John Wiley & Sons, New York.
6. Esbensen K. H. (2000) *Multivariate Data Analysis—In Practice.* Camo, Oslo, Norway.

第18章　2D凝胶的蛋白 Edman 测序

Setsuko Komatsu

摘要　采用聚偏氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜的免疫印迹技术是Edman测序最常用的方法。通过电转印，蛋白样品从2D-聚丙烯酰胺（2D-PAGE）凝胶转移到PVDF膜上，装载蛋白的这种膜可直接用于蛋白测序。如果经几个循环而测序结果不理想时，可将PVDF膜从测序仪上取下，再用去封闭溶液（deblocking solution）处理该膜。当上述方法失败时，可采用其他方法如Cleveland法。由于2D-PAGE的分辨率高，综合运用2D-PAGE、免疫印迹和Edman测序可大大提高蛋白测序的效率。

关键词　Edman测序；2D-PAGE；（N端）封闭蛋白（blocked protein）；去封闭（deblocking）；Cleveland法

18.1　前　　言

如能通过电转移或其他相关技术将蛋白样品从凝胶相有效转移到适合于气相测序（gas-phase sequencing）的其他介质上时，则2D凝胶分离的蛋白可进行Edman测序[1]。首先，皮摩尔数量级的蛋白通过2D-PAGE分离[2]，然后经电转移从2D-PAGE凝胶上转移到PVDF膜上，再通过Edman测序法进行蛋白质的氨基酸测序。蛋白质N端顺序测定法——Edman降解是非常灵敏的测序方法（只需1～5μg的蛋白质）。但是当出现缺口或模糊序列时，可以通过其他的方法来确认序列，而这往往需要更多的材料。

蛋白往往会进行翻译后修饰。N端肽段封闭是较为常见的蛋白修饰之一。蛋白N端封闭既可以在体内也可在体外进行。但蛋白质抽提、2D-PAGE和印迹可以防止这种N端封闭。使用非常纯的试剂，在抽提缓冲液、电泳和电转移缓冲液中加入自由基清除剂——巯基乙酸和进行预电泳以去除凝胶中的自由基清除剂都能有效阻止体外蛋白N端肽段的封闭[3]。然而，如果蛋白质的N端肽段在体内已封闭，则需用化学试剂、酶去封闭程序或者肽图谱程序来确定蛋白N端或内部的序列。

18.2　材　　料

（1）SDS抽样缓冲液：0.06mol/L Tris-HCl（pH 6.8），2% SDS，10%甘油，5%巯基乙醇[4]。

（2）分离胶用的丙烯酰胺（丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺＝ 30∶0.135）：30.00 g 丙烯酰胺，0.135g 甲叉双丙烯酰胺（BIS）。用 MQ（Millipore 公司的 MilliQ 净水设备处理过的水）水定容至 100ml，黑暗中保存（可使用棕色瓶子）。

（3）分离胶缓冲液（pH8.8）：称取 12.11g Tris-HCl 配成 1mol/L 的终浓度溶液，称取 0.27gSDS 配成 0.27%的终浓度溶液。溶于 80ml MQ 水中，调至 pH8.8，最后定容至 100ml。

（4）浓缩胶用的丙烯酰胺（丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺＝29.2∶0.8）：29.2g 丙烯酰胺，0.8g BIS。用 MQ 水定容至 100ml，黑暗中保存（可使用棕色瓶子）。

（5）浓缩胶缓冲液（pH6.8）：称取 3.03g Tris-HCl，配成 0.25mol/L 溶液，0.20g SDS 配成 0.2%溶液，溶于 80ml MQ 水中，调 pH 为 6.8，最后定容至 100ml。

（6）SDS-PAGE 电泳缓冲液：9g Tris-HCl，43.2g 氨基乙酸，3gSDS 溶于 3L MQ 水中。

（7）溴酚蓝（BPB）溶液：称取 0.1g BPB 溶于 100ml 10%的甘油中。

（8）印迹溶液 A：36.33g Tris-HCl（终浓度为 0.3mol/L），200ml 甲醇（终浓度为 20%），0.20g SDS（终浓度为 0.02%）。用 MQ 水定容至 1000ml，4℃保存。

（9）印迹溶液 B：3.03g Tris-HCl（终浓度为 25mmol/L），200ml 甲醇（终浓度为 20%），0.20g SDS（终浓度为 0.02%），用 MQ 水定容至 1000ml，4℃保存。

（10）印迹溶液 C：3.03g Tris-HCl（终浓度为 25mmol/L），5.20g β-氨基己酸（终浓度为 40mmol/L），200ml 甲醇（终浓度为 20%），0.20g SDS（终浓度为 0.02%），用 MQ 水定容至 1000ml，4℃保存。

（11）分离胶溶液 [一块胶的用量（18%）]：10ml 分离胶用的丙烯酰胺，6.3ml 分离胶缓冲液（pH8.8），120μl 10%APS，20μl TEMED。

（12）浓缩胶溶液 [一块胶的用量（5%）]：1ml 浓缩胶用的丙烯酰胺，3ml 浓缩胶缓冲液（pH6.8），2ml MQ 水，30μl10%APS，20μlTEMED。

18.3　方　　法

18.3.1　Cleveland 肽图谱[5]

（1）样品进行 2D-PAGE 分离，然后用考马斯亮蓝（CBB）染色，去除含有蛋白质点的凝胶碎片。

（2）用电泳浓缩仪洗脱凝胶中的蛋白质，2W 恒功率洗脱 2h。洗脱后，再用 MQ 水透析两天，再冻干。

a. 从 2D 胶中切下蓝色蛋白质点，用 MQ 水浸泡。

b. 在装有蛋白质点（含有 5～20 块凝胶碎片）的 2ml 离心管中加入 750μl 电洗脱缓冲液摇晃 30min。

c. 将 12～15cm 长的透析膜（小号，no. 24，Wako，Osaka，Japan）放入 250ml MQ 水中（用 300ml 烧杯）煮沸 5min。同时用 MQ 水浸湿小片玻璃纸。

d. 关闭装有透析膜的容器的小口，打开容器的大口，装上透析膜，扭转，用夹子夹住加以封闭（图 18-1A）。

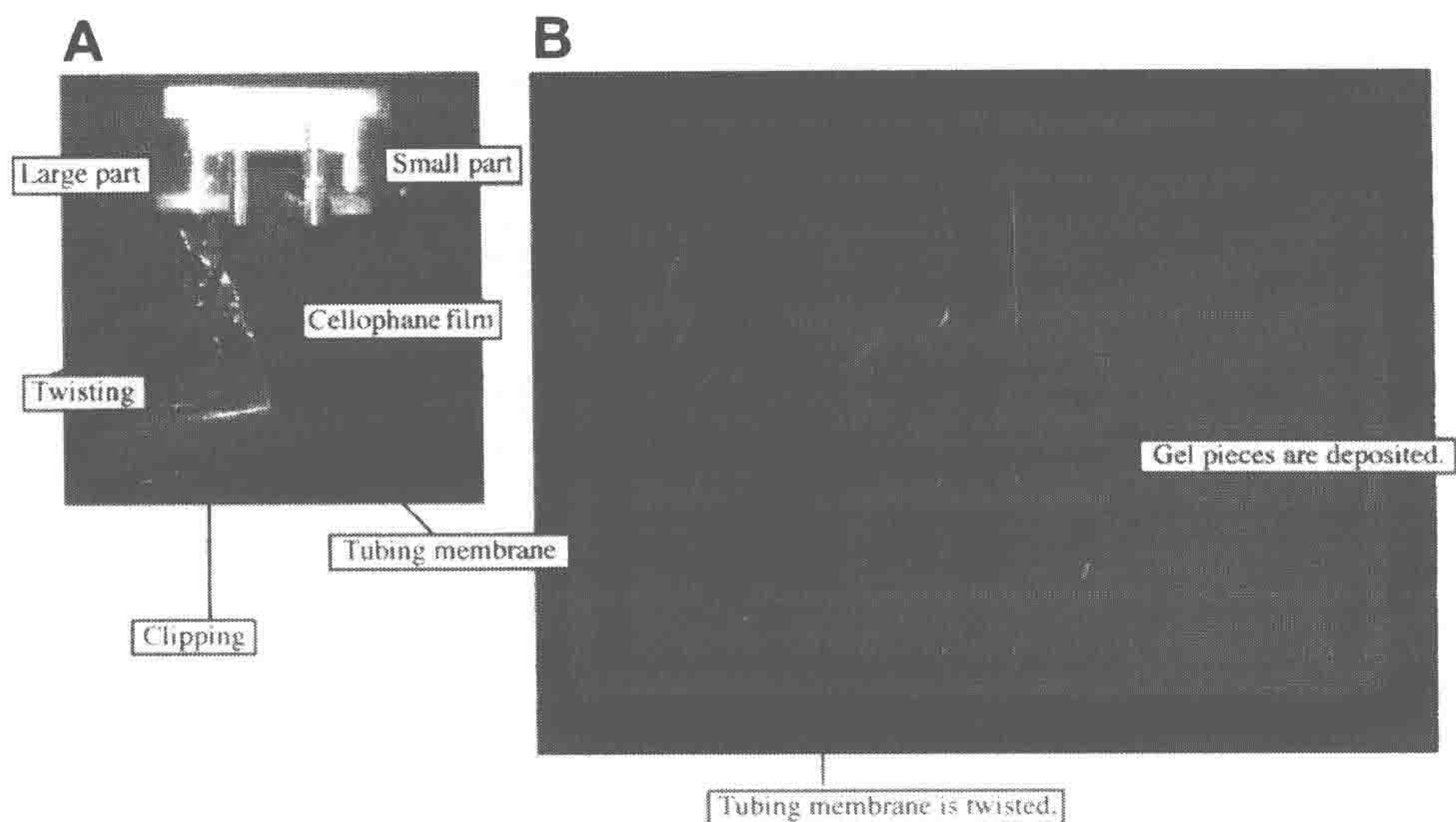


图 18-1　电泳浓缩仪

A. 连接长的透析膜的杯形容器的封闭端；B. 固定在电泳浓缩仪上的杯形容器

e. 将这个容器连接在电泳浓缩仪上（图 18-1B；Nippon Eido，Tokyo，Japan)。将含有蛋白的凝胶碎片放到玻璃纸上（玻璃纸连接在容器的小口上），加 750μl 电洗脱缓冲液。在容器的两端加入电洗脱缓冲液，容器两端通过缓冲液连接起来，这样蛋白质就可以从小口玻璃纸上转移到大口的透析膜上。加入电洗脱缓冲液，装有蛋白质的小口部分要和正极连接。

f. 2W 恒功率通电跑 2h。

g. 去除透析膜，用夹子夹住加以封闭，在 4℃透析，第一天换水（去离子水）3 次，第二天换水（MQ 水）2 次。

h. 将蛋白质溶液置于 2～6 个 2ml 的离心管中，冷冻干燥过夜。

i. 将蛋白溶解于 30μl 的 SDS 抽样缓冲液中。

(3) 蛋白质溶解于 20μl 的 SDS 抽样缓冲液中（pH6.8），然后上样，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将含有 10μl 金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶（Pierce，Rockford，IL）(0.1μg/μl) 和 10μlSDS 抽样缓冲液（pH6.8）的溶液覆盖在蛋白质样品上。开始电泳，直到当蛋白质样品和蛋白质酶汇聚到浓缩胶时，关闭电源。30min 消化蛋白质，然后继续电泳。

a. 用夹子固定玻璃板（100ml×140mm×1mm)，玻璃板间为 1mm 间距。

b. 在 100ml 的烧杯中制备分离胶溶液。混合溶液，灌胶使胶面低于板上部 3cm（提示：当加了 10%APS 和 TEMED 后要立即灌胶）。

c. 用 1ml 的 MQ 水覆盖分离胶。

d. 将胶置于室温下 40～60min 进行聚合反应。

e. 倒掉过多的水，准备灌入浓缩胶溶液。

f. 在 100ml 的烧杯中制备浓缩胶溶液，灌入分离胶上，插入梳子。

g. 将胶置于室温下 20min 聚合。

h. 拔出梳子，卸下夹子，去掉硅胶条。

i. 用注射器清洗加样孔。

j. 将玻璃板安装到电泳槽上，倒入 SDS-PAGE 电泳缓冲液。

k. 蛋白溶解于 20μl SDS 抽样缓冲液中（pH6.8），然后上样，进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。将含有 10μl 金黄色葡萄球菌 V8 蛋白酶（0.1μg/μl）和 10μl SDS 抽样缓冲液（pH6.8）的溶液覆盖在蛋白质样品上，加入 30μl 的溴酚蓝溶液。

l. 开始电泳，直到蛋白质样品和蛋白酶汇聚到浓缩胶时，关闭电源，30min 消化蛋白质。

m. 35mA 恒流跑电泳，直到溴酚蓝指示线到达距底部 5mm 处。

n. 停止电泳，取出玻璃板。

o. 用抹刀分开玻璃板。

p. 去掉浓缩胶，取出分离胶。

18.3.2　N 端及内部氨基酸序列分析，氨基酸序列的同源比较分析

（1）经过 2D-PAGE 或 Cleveland 方法分离的蛋白通过半干转移印迹仪（Nippon-Eido，Tokyo，Japan）电转移到 PVDF 膜上（Pall，Port Washington，USA），然后通过考马斯亮蓝染色观察。

a. 剪一块 PVDF 膜，大小和胶一样。

b. 剪一块 3MM 沃特曼滤纸，大小和胶一样。

c. 用甲醇清洗 PVDF 膜几秒钟，再将膜放入 100ml 的印迹溶液 C 中，轻摇 5min。

d. 分别在印迹液 A、B、C 中浸润两张印迹滤纸（3MM）。

e. 将分离胶放入 100ml 印迹液 C 中，轻摇 5min。

f. 用 MQ 水润湿半干转移印迹仪，将浸湿在印迹液 A 中的滤纸放在印迹板上，再放上浸湿在印迹液 B 中的滤纸。如有气泡应全部消除。再依次放上 PVDF 膜、分离胶和浸湿在印迹液 C 中的滤纸。

g. 接通电源，以 $1mA/cm^2$ 的电流跑 90min。

h. 用 100ml 的 MQ 水清洗膜。

i. 用考马斯亮蓝染色 2～3min。

j. 用 60%的甲醇脱色 3min，共两次。

k. 胶在用 MQ 水洗后，室温干燥。

（2）将染色的蛋白质点或条带从 PVDF 膜上切下，放置于气相蛋白质测序仪 Procise 494 或 cLC（Applied Biosystems，Foster City，CA）反应室的上部玻璃区域，运用 Applied Biosystems 提供的标准程序进行 Edman 降解，得到的乙内酰苯硫脲氨基酸（PTH）通过在线高效液相色谱（HPLC）进行分离，根据保留时间进行鉴定。

(3) 通过网络 FastA 程序搜索 Swiss-Prot，PIR，Genpept，PDB 数据库，得到的氨基酸序列跟数据库中已知的蛋白质进行比较分析。

18.3.3 印迹蛋白质的去封闭[6]（见注释 1）

1. 乙酰丝氨酸和乙酰苏氨酸

N 端含有乙酰丝氨酸和乙酰苏氨酸的蛋白质通过电转移转到 PVDF 膜上，带有蛋白的 PVDF 膜切下来后用三氟乙酸 60℃处理 30min，然后进行蛋白质测序（见注释 2）。

2. 甲酰化基团

甲酰化蛋白通过电转移转到 PVDF 膜上，PVDF 膜切下来后在 300μl 0.6mol/L HCl 溶液中在 25℃处理 24h。之后将膜用 MQ 水洗干净，干燥完后可进行测序。

3. 焦谷氨酸

(1) N 端含有焦谷氨酸的蛋白通过电转移转到 PVDF 膜上。

(2) 带有蛋白的 PVDF 膜切下来后用 200μl 100mmol/L 的冰醋酸［含 0.5%(*m*/*V*)聚乙烯吡咯烷酮碘 PVP-40］在 37℃处理 30min（见注释 3）。

(3) 用 1ml 的 MQ 水洗膜 10 次。

(4) 用 100μl 0.1mol/L 的磷酸缓冲液（pH 8.0）（含 5mmol/L 二硫苏糖醇和 10mmol/L EDTA）浸润 PVDF 膜。

(5) 加入 5μg 焦谷氨酰肽酶后，30℃处理 24h。

(6) PVDF 膜用 MQ 水洗净，干燥后用于测序[6]。

18.4 注　　释

(1) 这些去封闭技术可以结合起来使用，也可以对固定在 PVDF 膜上的未知蛋白进行测序。结合在 PVDF 膜上的蛋白可直接用于测序。如果此时测序失败，可以取下 PVDF 膜，依次去除乙酰基、甲酰基和焦谷氨酸基，然后再测序。

(2) 这种方法的优点是方便快捷，尽管与酰基氨基酸释放酶（AARE）消化相比，总的测序产率低。固定在膜上的蛋白先用胰蛋白酶消化后产生 N 端肽段。N 端肽段上的 *N*-乙酰化蛋白：*N*-乙酰化蛋白可用酰基氨基酸释放酶（AARE）进行去封闭。由于 AARE 解除短肽的酰基氨基酸，因此需要先用胰蛋白酶进行消化蛋白[6]。

(3) PVP-40 用来解离 PVDF 膜上的焦谷氨酸，而剩下的蛋白还结合在膜上。

参 考 文 献

1. Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H., and Lottspeich, F. (1988) A new siliconized-gas fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. *Eur. J. Biochem.* **176,** 509–512.
2. O'Farrell, P. F. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021.
3. Hirano, H., Komatsu, S., Kajiwara, H., Takagi, Y., and Tsunasawa, S. (1993) Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by Western blotting. *Electrophoresi* **14,** 839–846.
4. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.
5. Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Krischer, M. W., amd Laemmli, U. K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulphate and analysis by gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* **252,** 1102–1106.
6. Hirano, H., Komatsu, S., Nakamura, A., et al. (1991) Structural homology between semidwarfism-related proteins and glutelin seed protein in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **83,** 153–158.

第19章　肽质量指纹图谱——MALDI-TOF法鉴定蛋白质

Nicolas Sommerer，Delphine Centeno 和 Michel Rossignol

摘要　MALDI-TOF 肽质量指纹图谱（PMF）是鉴定蛋白质较为快捷、方便的方法，所研究的基因组已经完成了测序和注释，蛋白质可以通过二维凝胶电泳分离和检测。研究植物蛋白质组有两个困难：一是只有少量植物完成了基因组测序，二是主要污染物来自于非植物本身。本章介绍了经典的“自下而上”的方法（即从多肽到蛋白识别）：凝胶切割，凝胶消化，肽回收和净化，MALDI-TOF 质谱，蛋白质数据库查询。

关键词　肽质量指纹图谱（PMF）；MALDI-TOF；TOF/ TOF；胰蛋白酶；凝胶胰蛋白酶消化；蛋白质鉴定；数据库搜索

19.1　前　　言

值得注意的是，蛋白质质谱（MS）鉴定是在20世纪80年代后期基于“软”电离技术发展起来的，这些电离技术包括欧洲 Michael Karas 和 Franz Hillenkamp 开发的基质辅助激光解吸电离（MALDI）和美国 John Fenn 开发的电喷雾电离（ESI）。John Fenn 和 Takana 由于开发了“软解吸电离方法应用于生物大分子的质谱分析”，而获得了2002年诺贝尔化学奖。

由于蛋白质提取物能充分分离和兼容二维凝胶的染色（见第16章和第17章），因此适合于通过 MS 进行蛋白质鉴定。然而，整个蛋白质的 MS 不等于蛋白质的直接鉴定。要达到灵敏度高、准确度好并能访问大部分数据（覆盖序列），蛋白质必须由内切蛋白酶（endoprotease）消化产生多种蛋白质的特定片段。如果内切蛋白酶有足够的特异性、数据库中有蛋白质的信息，则通过对实验样品肽质量（由内切蛋白酶消化产生、通过 MALDI-TOF 质谱检测）与数据库中所有蛋白质硅片消化的肽质量的推断比较，就能对候选蛋白质进行鉴定。

植物蛋白质组学使用的技术类似于其他蛋白质组研究。然而，特别要注意样品生物起源的特殊性。事实上，与动物基因组相比，植物的基因组较大（通常为多倍体），目前只有少量的植物基因组已经完成了测序和注释。拟南芥是第一个完成基因组测序的植物（2000年12月）。对于没有测序的植物，也许可以获得部分蛋白质信息；但对于大多数植物［主要是木本和谷类（除了水稻）植物］来说，基因组信息很少。因此对于没有测序的品种，也许可以通过同源性比较对蛋白质进行鉴定。对于未鉴定的蛋白质，MS / MS 肽测序可能是鉴定蛋白质的唯一有效方法（无论是 MALDI-TOF/TOF 还是纳米液相色谱法［(LC) -ESI-MS/MS]。此外，不能首先使用植物特定的数据库，这是

因为大部分蛋白质污染有人或哺乳动物的信息。

实验步骤如下所述。

(1) 从凝胶上切除蛋白点，用胰蛋白酶进行凝胶消化（见19.3.1）。

(2) 将消化的样品沉积MALDI标基上，MALDI-TOF谱获取信息并进行注释（见19.3.2）。

(3) 数据库搜索，仔细查验搜索匹配的片段（见19.3.3）。

19.2 材　　料

19.2.1 仪器设备

(1) 干净的真空离心机。

(2) 干净的烤箱（高达56 ℃）

(3) 现代（20世纪90年代末以来）MALDI- TOF质谱仪（配有延迟或脉冲离子萃取技术和静电反射镜［反射（MALDI- reTOF)］。

19.2.2 试剂

1. 胶内消化

(1) 水（HPLC级 或 Milli- Q级）。

(2) 高纯度碳酸氢铵。

(3) 乙腈［高效液相色谱（HPLC）级］。

(4) 三氟乙酸（TFA；HPLC级）。

(5) n-Octyl-glycopyranoside（n-OGP）。

(6) 测序级猪胰蛋白酶。虽然也可用其他优质的测序级猪胰蛋白酶，但为了均一性和方便，使用Promega公司的测序级猪胰蛋白可以优化实验方案和数据。

(7) 碳酸氢铵缓冲液：25mmol/L碳酸氢铵缓冲液，pH7.8。

(8) 乙腈/碳酸氢铵缓冲液：50/50（*V*/*V*）乙腈/25mmol/L碳酸氢铵缓冲液（pH7.8）。

(9) 消化缓冲液（冰浴配制）：0.0125μg/μl测序级胰蛋白酶，溶解于25mmol/L碳酸氢铵缓冲液（含5mmol/L n-OGP）。

2. MALDI- TOF质谱

(1) α-氰基-4-羟基肉桂酸粉末，重结晶。

(2) 水（HPLC级或Milli-Q级）。

(3) 乙腈（色谱纯）。

(4) 丙酮（色谱纯）。

(5) 乙醇（色谱纯）。

(6) TFA溶液：0.1%TFA（HPLC级）水溶液。

（7）乙腈/ TFA 溶液：3∶2（*V*/*V*）乙腈/0.1%TFA 水溶液。

（8）乙腈/ TFA 溶液：1∶1（*V*/*V*）乙腈/0.1%TFA 水溶液。

（9）乙醇/丙酮/ TFA 溶液：6∶3∶1（*V*/*V*/*V*）乙醇/丙酮/0.1%TFA 水溶液。

19.3　方　法

许多凝胶染色方法适用于后续的 MALDI- TOF 肽质量指纹图谱（PMF）分析。在第 14 章已经比较讨论了一些染色方法的性能和兼容性。

19.3.1　胶内消化

凝胶消化方法改编自 Jensen 等。

对于凝胶处理和消化步骤，必须认真处理样品，尽量减少外源性角蛋白的污染（如头发、皮肤、羊毛衣服、气流、通风冷却等）（见注释 1）。

1. 从二维聚丙烯酰胺凝胶挖蛋白质点

（1）将 1ml 枪头在离尖端 5mm 处用刀片切除，做一个打孔器（切口直径 1～2mm）（见注释 2）。

（2）挖取凝胶点，并转移到离心管中。

2. 清洗凝胶碎片

（1）用 100μl 碳酸氢铵缓冲液清洗（振荡 15min），然后弃上清液。

（2）用 100μl 乙腈/碳酸氢铵缓冲液洗两次（振荡 15min），然后弃上清液。

（3）用 100μl HPLC 级乙腈清洗（振荡 15min）使凝胶碎片收缩，然后弃上清液。

（4）离心式蒸发器上真空干燥凝胶碎片。

经上述洗涤后，凝胶片段在－20°C 可以贮存几个星期，可再用于凝胶消化。

对于二维凝胶，在凝胶消化之前没有必要进行半胱氨酸残基的还原和烷基化（见注释 3）。

3. 胶内消化（见注释 4 和注释 5）

（1）将凝胶碎片置于冰上（见注释 6），加入 8μl 冷却的消化缓冲液。

（2）20min 后，用少量碳酸氢铵缓冲液调整以覆盖凝胶。

（3）37℃温育 4h（或过夜，见注释 7）。

4. 多肽片段的提取、浓缩、脱盐

1）多肽片段的提取

（1）加入 20μl TFA 溶液（超声 15min），提取胰蛋白酶消化产生的多肽片段。上清液保存在 500μl 离心管中。

（2）用 20μl 的 3∶2 乙腈/ TFA 液提取（超声 15min）。收集上清液。

2）肽浓缩和脱盐

（1）通过真空离心机将上清液浓缩到大约 10μl 的体积。这一步去除乙腈（否则多肽片段将不能固定在疏水色谱介质），并减少体积量至合适的范围以便能进行下一步的色谱操作。

（2）牢牢固定 ZipTip 在 10μl 的可调移液管上（背压可能很高）。

（3）用 10μl 的 3∶2 乙腈/ TFA 溶液清洗 ZipTip 5 次。去除清洗液。

（4）用 10μl 的 TFA 溶液平衡 ZipTip 5 次。去除清洗液。

（5）不用抬高吸管尖头，慢慢吸出和分散 10μl 浓缩上清液 10 次，固定住肽片段。

（6）用 10μl TFA 溶液清洗固定的肽（脱盐）4 次。去除清洗液。

（7）用 2μl 的 1∶1 乙腈/TFA 溶液洗脱多肽片段至 500μl 微量离心管中。

19.3.2　MALDI-TOF 肽质量指纹图谱

（1）在 MALDI 过程中，样品通常是与芳香有机物共结晶出来。这些有机物通常是酸性化合物（基质），主要性质是吸收紫外激发波长（一般为氮激光的 337nm 波长或三倍频率的 Nd：YAG 激光的 355nm 波长）。在解吸过程中，当紫外激光发射时，基质的芳香基团（大量存在，超过 10 000∶1）吸收紫外能量，导致基质升华为气态，不致于使样品分解或解离。

（2）电离过程是发生在带电的基质离子和中性的肽片段之间（离子-分子反应）的高浓度、不停扩张和冷却的气相质子交换过程。

（3）一旦解吸和电离，TOF 管中的样品加速冲向探测器，它的速度（在固定长度飞行管的 TOF）与 m/z 的均方根成正比。

（4）该反射镜（静电镜）修正初始动能分布，因而能提高质量分辨率和质量准确度（具有较大动能的等压离子在反射镜中有更大的路径，在探测器聚焦平面以较低的动能）。

（5）延迟或脉冲离子的萃取会纠正初始空间分布，因而再次提高分辨率和质量准确度（根据离子从源头到分析仪提取开始时的位置，解吸室的等压离子将会加速空间分布）。

现在有许多涉及 MALDI-TOF 和 MS 基本知识的专业文献或书，也可参阅它们。

MALDI-TOF 质谱技术是 PMF 的首选，主要是因为 MALDI-TOF 具有一些优势特点。

（1）软电离技术（在 MALDI 过程中肽片段能保持完整）。

（2）电离方法也适合不同多肽混合物的分析，该方法较耐污染（缓冲液、盐、增塑剂等）。

（3）方法灵敏度高（有 MALDI 过程和 TOF 质量分析仪）。

（4）良好的分辨率，目前已经超过 15 000［全宽，半质量（FWHM）］，在感兴趣的质量范围可检测单一同位素峰。

（5）TOF 分析仪具有很高的质量精度（通常为 10～30ppm）。

（6）能快速得到实验数据。

1. 目标样本沉积

1）经典干燥液滴法

（1）半饱和α-氰基-4-羟基肉桂酸（约5mg/ml）的配制：将α-氰基-4-羟基苯甲酸溶解在300μl 1∶1乙腈/ TFA溶液（超声10min）。离心几秒钟得到上清液。取200μl上清液加到微量离心管中，并加入相同体积（200μl）的1∶1乙腈/ TFA溶液，就能配制成获得半饱和的α-氰基-4-羟基肉桂酸。

（2）取0.8μl消化溶液和0.8μl基质加到微量离心管中，快速混合（避免在吸管尖结晶）。取0.8μl混合液滴到MALDI标基上，其余的0.8μl混合液可滴在MALDI标基的另一个位置。吸管尖头不要接触到标基。

（3）让混合液自然干燥并结晶出来（见注释8）。

2）在疏水标基上干燥液滴法（见注释9）

（1）准备α-氰基-4-羟基肉桂酸：称取10mg的α-氰基-4-羟基肉桂酸，溶解在1ml的1∶1乙腈/ TFA溶液中（超声10min）。取56μl上述溶液放入一新的微量离心管中，并添加944μl的1∶1乙腈/ TFA溶液。

（2）将0.8μl凝胶消化后的上清液（见19.3.1节3）和0.8μl上述溶液快速混合。取0.8μl混合液滴到MALDI标基上，其余的0.8μl混合液可滴在MALDI标基的另一个位置[见19.3.2节1.1)]。

（3）让混合液自然干燥并结晶。

（4）滴加4μl TFA溶液到晶体上，接触30s后，用吸管吸走液体（吸管尖不要接触晶体）。

（5）加入0.8μl的乙醇/丙酮/ TFA溶液，再次结晶。

（6）让混合液自然干燥并结晶出来。

2. 光谱采集

（1）将标基插入质谱仪中，并在真空中（低于10^{-6} Torr）稳定。

（2）打开高压[最好等待20min让电压和温度恒定（焦耳效应）]。

（3）调整激光功率（衰减）和标基位置，以便在700～4000Th能得到好的信噪比和单一同位素分辨率。

（4）先激光发射10次，但所得图谱没有多大价值，因为它们通常是小质量分子（基质和/或盐）的嘈杂图。

（5）激光发射80～200次，获取图谱并进行叠加。

（6）在842.5099Th和2211.1046Th处用水解胰蛋白酶得到离子进行质谱内部校正。

（7）保存图谱（见注释10）。

3. 图谱解析

对单一同位素质量可以进行自动指认，但我们建议应仔细检查这些解析（见注释11和注释12）。

如果没有对图谱进行平滑处理，可以对所有的初次单一同位素肽段峰进行解析，除了已知的胰蛋白酶产生的峰（图 19-1，见注释 13 和注释 14 的细节描述）。

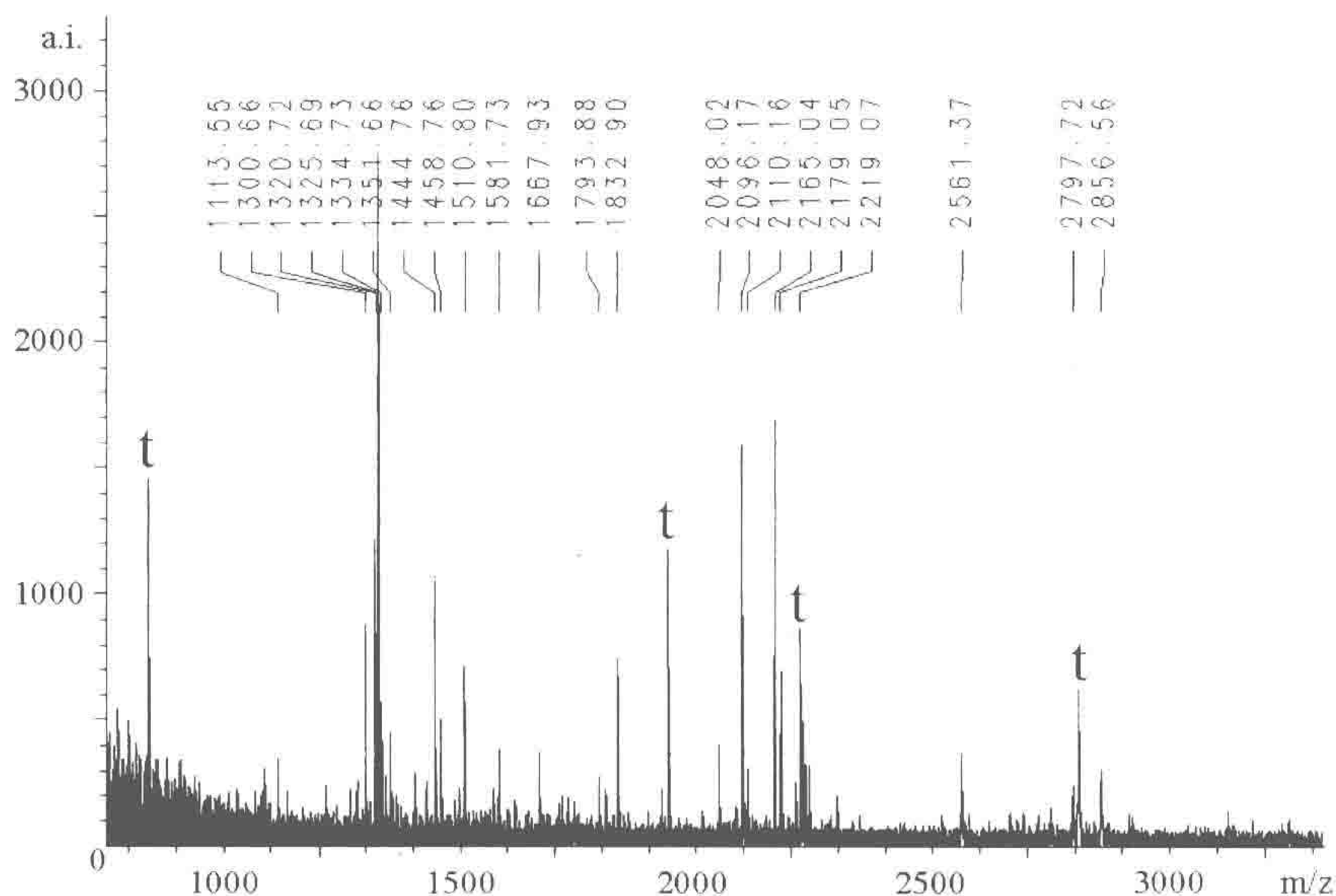


图 19-1　豌豆蛋白提取物的 MALDI-TOF 肽段质量指纹图谱

19.3.3　MASCOT 数据库检索使用并搜索结果的评价

下面描述的步骤是针对 MASCOT PMF 搜索引擎（Matrix Science，London，UK）内部授权（见注释 15）或使用远在伦敦的服务器（http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl? SEARCH=PMF）。

当然，所述的搜索策略也可直接适用于其他搜索引擎（见注释 16）。

1. 搜索的第一步骤

这个步骤（图 19-2 的左边）的目的是为了获得数据质量的总貌，以消除可能的污染物，并有可能直接确认植物蛋白质。

（1）确定一个全球开放的数据库（如 MSDB，NCBInr 或 SWISS-PROT），而不是特定物种之一，数据库包含有非植物的蛋白质污染物。

（2）不要在分类学领域（即“所有项目”）指定品种，以确定非植物的蛋白质污染物。

（3）允许错过一个缺口。

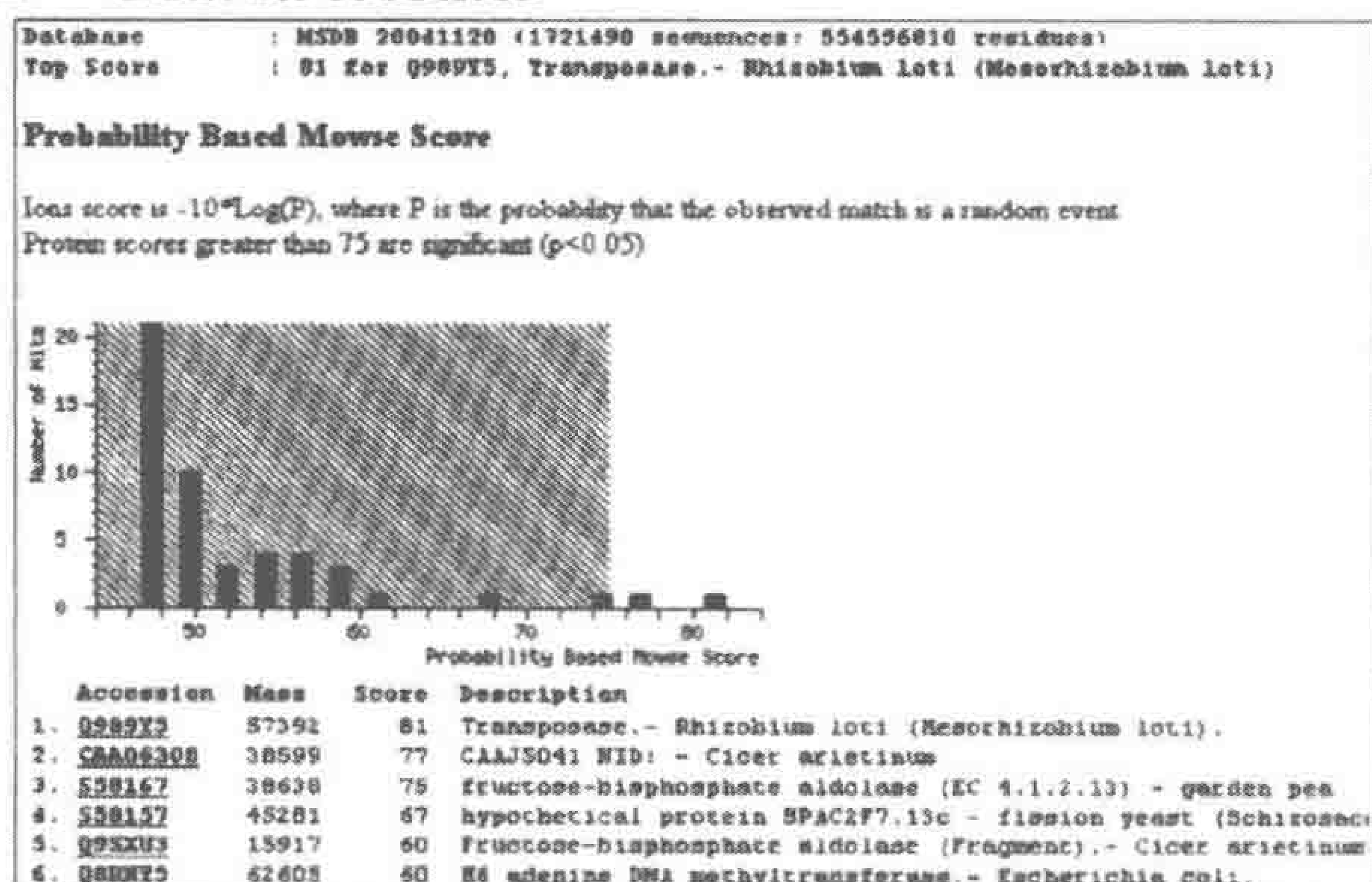
（4）设置一个大的质量承受值为 100ppm，以评估质谱校准（用于质谱校准的两个胰蛋白酶水解的肽段，它们的丰度和离子统计学意义可能很低，不能进行很好校准）。

（5）固定化修饰：羧甲基（C）或脲甲基（C）。用碘乙酸或碘乙酰胺还原和烷基化凝胶样品的蛋白半胱氨酸残基，会分别产生羧甲基半胱氨酸或酰胺甲基半胱氨酸（包括在脲甲基半胱氨酸中）。

A Search Parameters

Your name: INRA UMR Proteomique　　Email: sommerer@ensam.inra.fr
Search title: ca23
Database: MSDB
Taxonomy: All entries
Enzyme: Trypsin　　Allow up to 1 missed cleavages
Fixed modifications: Biotin (K), Biotin (N-term), Carboxymethyl (C), Deamidation (NQ)
Variable modifications: Acetyl (K), Acetyl (N-term), Amide (C-term), Biotin (K), Biotin (N-term)
Protein mass: kDa　　Peptide tol. ± 100 ppm
Mass values: MH⁺ / M_r　　Monoisotopic / Average
Data file
Query: 1113.551280, 1300.655790, 1320.717147, 1325.692492, 1334.731007, 1351.659345
Overview　　Report top 20 hits
Start Search ...　　Reset Form

B Search Results



Database : MSDB 20041120 (1721490 sequences; 554556810 residues)
Top Score : 81 for Q989Y5, Transposase.- Rhizobium loti (Mesorhizobium loti)

Probability Based Mowse Score

Ions score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event
Protein scores greater than 75 are significant (p<0.05)

	Accession	Mass	Score	Description
1.	Q989Y5	57392	81	Transposase.- Rhizobium loti (Mesorhizobium loti).
2.	CAA06308	38599	77	CAAJ5041 NID: - Cicer arietinum
3.	S58167	38638	75	fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) - garden pea
4.	S58157	45281	67	hypothetical protein SPAC2F7.13c - fission yeast (Schizosac
5.	Q9SXU3	15917	60	Fructose-bisphosphate aldolase (Fragment).- Cicer arietinum
6.	Q8XXY5	62605	60	N6 adenine DNA methyltransferase.- Escherichia coli.

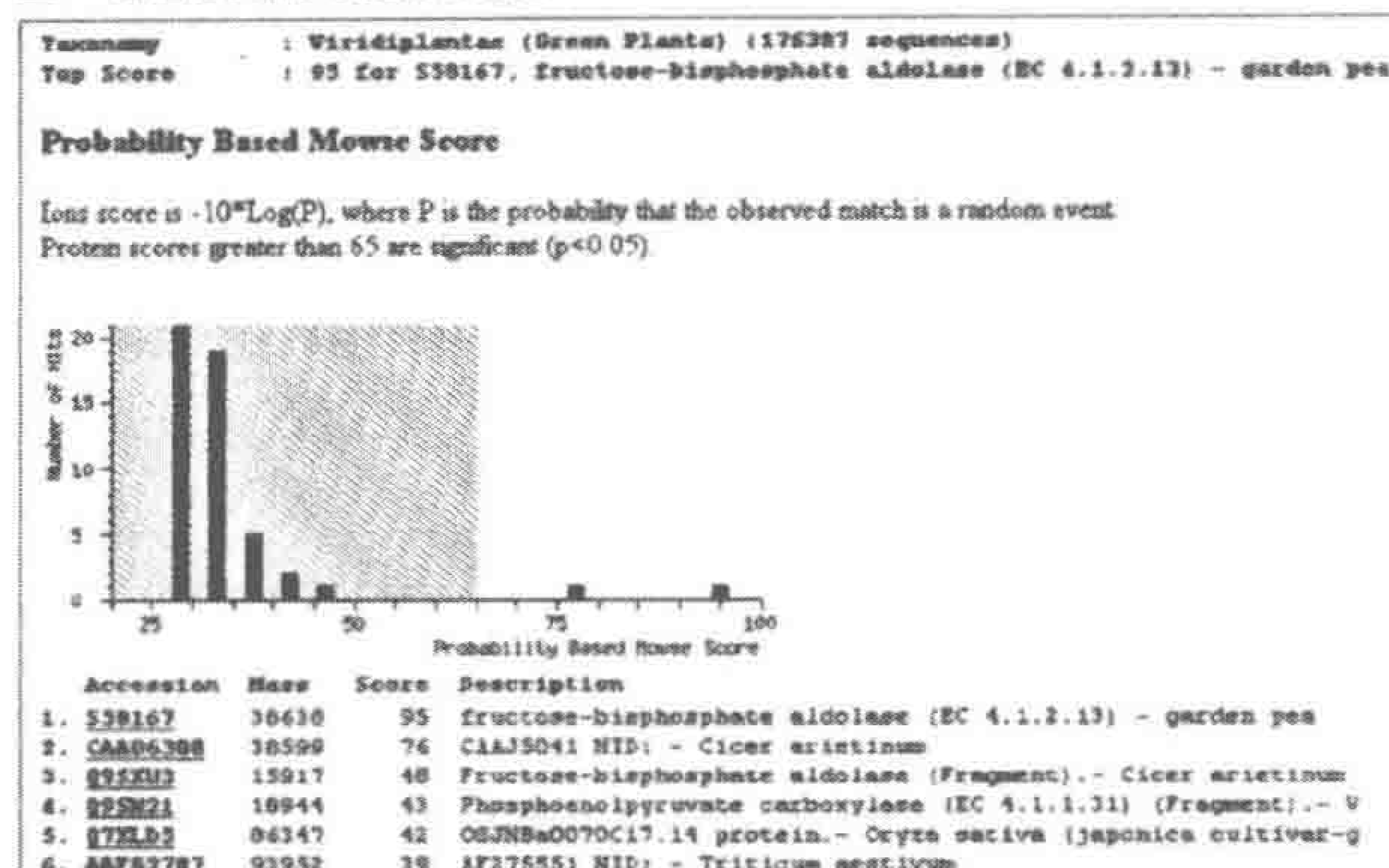
C Top score hit is incorrect

Q989Y5　　Mass: 57392　　Score: 81　　Expect: 0.013　　Peptides matched: 8
Transposase.- Rhizobium loti (Mesorhizobium loti).

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start	End	Miss	Peptide
1300.66	1299.65	1299.66	-0.01	415 -	426	0	AWQALDAALDAR
1351.66	1350.65	1350.65	-0.00	374 -	384	1	HAERGHNIDFR
1444.76	1443.75	1443.66	0.09	219 -	229	1	DFTRNYEALCR
1510.80	1509.80	1509.83	-0.03	333 -	345	1	VTYSVPSRLIGYR
1581.73	1580.72	1580.82	-0.10	311 -	324	1	RTTDFTLVSADVTR
1667.93	1666.92	1666.87	0.05	378 -	391	1	GHNIDFRHFIGNLK
2179.05	2178.04	2178.10	-0.05	114 -	132	1	ALNGGEKEIFFPQHHEIGR
2219.07	2218.06	2218.21	-0.15	58 -	75	1	TRPDPLEQIWPRVEELLK

D Search Parameters

Your name: INRA UMR Proteomique　　Email: sommerer@ensam.inra.fr
Search title: ca23
Database: MSDB
Taxonomy: . . . . Viridiplantae (Green Plants)
Enzyme: Trypsin　　Allow up to 1 missed cleavages
Fixed modifications: Biotin (N-term), Carboxymethyl (C), Deamidation (NQ), K-acetimidoylation (K)
Variable modifications: N-Acetyl (Protein), N-Formyl (Protein), Oxidation (HW)
Protein mass: kDa　　Peptide tol. ± 40 ppm
Mass values: MH⁺ / M_r　　Monoisotopic / Average
Data file
Query: 1113.551280, 1300.655790, 1320.717147, 1325.692492, 1334.731007, 1351.659345
Overview　　Report top 10 hits
Start Search ...　　Reset Form



F　Top score hit is correct

S38167　Mass: 38638　Score: 95　Expect: 5.6e-005　Peptides matched: 13

fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13) - garden pea

Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Start - End	Miss	Peptide
1320.72	1319.71	1319.72	-0.01	239 - 250	0	VAPEVIAEHTVR
1325.69	1324.69	1324.69	-0.01	288 - 299	0	KPWTLSFSFGR
1334.73	1333.72	1333.74	-0.01	239 - 250	0	VAPEVIAEHTVR + Me-ester (DE)
1510.80	1509.80	1509.81	-0.01	287 - 299	1	GKKPWTLSFSFGR
1832.90	1831.90	1831.91	-0.01	8 - 24	0	YHDELIANAAYIGTPGK
2048.02	2047.01	2047.04	-0.02	6 - 24	1	SKYHDELIANAAYIGTPGK
2096.17	2095.17	2095.17	-0.00	84 - 104	0	TAAGKPFVDVLNEAGVLPGIK
2110.16	2109.16	2109.18	-0.03	84 - 104	0	TAAGKPFVDVLNEAGVLPGIK + Me-ester (DE)
2165.04	2164.03	2164.03	0.00	150 - 169	0	IGANEPSEHSIHENAYGLAR
2179.05	2178.04	2178.05	-0.00	150 - 169	0	IGANEPSEHSIHENAYGLAR + Me-ester (DE)
2219.07	2218.06	2218.07	-0.01	108 - 130	0	GTVELAGTDGETTTQGLDGLGER
2561.37	2560.36	2560.26	0.10	105 - 130	1	VDKGTVELAGTDGETTTQGLDGLGAR
2856.56	2855.55	2855.49	0.07	212 - 238	0	ALSDHHVILEGTLLKPNMVTPGSDAPK + Oxidation (M)

图 19-2　图 19-1 肽质量指纹的数据库搜索。Left raw 说明第一个搜索步骤（见 19. 3. 3 节 1 所述）。Right raw 说明后续的搜索（见 19. 3. 3 节 2 所述）

A. 第一步搜索参数：大数据库，分类单元不受限制，大的质量容许值，没有变量修改。B. 搜索得出的结果。两个蛋白的命中率高（得分大于临界值）。C. 不正确的最高命中率。错误的分类（但没有污染物），太多的错误裂解的肽段，质量准确度低但质量分散高。D. 第二搜索步骤。分类限制为 iridiplantae，根据样品修改两个变量，经校准检查后质量精度限制为 40ppm。E. 搜索给出的结果。两个蛋白质的命中率很高，命中率高和命中率低的巨大差别。F. 正确的最高命中率。右边的分类已鉴定，蛋白质质分子质量与凝胶数据对应，好的质量准确度高但分散性低（超出校准范围，肽段质量不太准确），正确裂解/错误裂解比例低于 3 : 1 的比例。未显示的数据：与凝胶数据相符的蛋白质等电点（6. 7）的，序列覆盖率为 38%，定位在所有蛋白序列中匹配的肽段。注：命中率第二的对应相近物种（鹰嘴豆）的一个同源蛋白，但匹配肽段要少

（6）变量的修改：无。

如果数据结果好（信噪比好，质量准确度高，污染物少）以及数据库中能搜索到参考的蛋白质，则可以得到希望的蛋白质信息（图 19-2B）。

候选蛋白质的评价标准有下面几条：

（1）分数优于重要临界值。

（2）最优蛋白质与非相关的蛋白质之间差别较大。

（3）所研究物种（或同源性很高的相近物种）的蛋白质为最优蛋白质第一级。

（4）候选蛋白质的分子质量和等电点与二维凝胶数据兼容。

（5）良好的质量准确度（最好）或不好的质量准确度（由于校准失败或错误校准问题），但在质量范围内，与质量分散具有低的和线性分布的关联。

（6）一个裂解的肽段对三个匹配肽段的最大化。

(7) 5 个匹配肽段的最小化。

(8) 在蛋白质序列和序列覆盖中匹配肽段同质定位(见注释 17 和图 19-2C)。

2. 第二步和后续搜索步骤

如果搜索没有得到结果，或者如果太多的峰(如超过 10 个)没有匹配(可能表明挖的点包含两个或更多的蛋白)(见注释 18 和图 19-2 的右边图)，就需要进行进一步的搜索。

可选择更多的搜索条件(图 19-2D):

(1) 删除确定非植物蛋白肽的消化污染物峰(“搜索无与伦比”的吉祥物选项按钮)。

(2) 设置质量公差根据实际观察到的质谱的质量准确度(如作为评估非植物蛋白质污染物或核实有关胰蛋白质酶自动酶解片段)。通常情况下，优质的搜索要求质量准确度低于 30ppm(较低值更好)。

(3) 允许用非化学计量或不可预测的化学修饰搜索(主要是蛋氨酸氧化，天冬氨酸和谷氨酸甲基酯酰化，N 端焦谷氨酰甲基化(pyroglutamylation) (见注释 19)。

(4) 限制类群的搜索范围(如 Viridiplantae 蛋白质数据库)。

(5) 允许在一个特定的数据库搜索。

在小节 3. 3. 1 中提及说明的评价和确认标准仍然很有必要(图 3-2E 和 F)。同时，鉴定混合物中次级组分也很重要。

通过肽质量指纹图谱(PMF)成功鉴定一个蛋白质后，在 MALDI-TOF 质谱中往往还有好几个离子峰不能鉴定出来。这些未鉴定出来的峰可能有不同的来源:

(1) 在电泳凝胶中共同迁移的其他蛋白质的肽段离子峰。

(2) 同一蛋白质的肽段离子峰，但是它的氨基酸序列和搜索数据库中的蛋白质序列有微小的差异(可能是基因组注释错误或突变引起的)。

(3) 同一蛋白质的肽段离子峰，但是由于翻译后修饰的缘故，它的分子质量与预测的肽段质量不一致。

(4) 因蛋白质污染出现的肽段离子峰(如角蛋白或胰蛋白)。

(5) 因多聚体残渣或塑化剂污染出现的非肽段离子峰。

(6) 因生物化学试剂药品污染出现的非肽段离子峰。

19. 3. 4 MALDI-TOF/TOF 策略

通过 PMF 鉴定的蛋白质只是作为初步的候选，鉴定蛋白质的得分情况表明可信程度。因此，我们应该进一步对 PMF 所得的离子峰进行二级测序，来提高并确认鉴定蛋白质的可信性。

在最近的 TOF/TOF 串联质谱分析仪未发明之前，在 MALDI 质谱分析仪上对肽段进行测序的成功率并不高。在 TOF/TOF 分析仪上，一级 TOF 能分离得到我们所需的肽段离子，其他肽段离子直接去掉，通过一级 TOF 的轰击筛选后，剩余的肽段都是特异的氨基酸序列肽段。然后二级 TOF 分离并测量这些特异氨基酸序列片段的分子

质量。

1. 鉴定确认

为了确认鉴定的可信性，从单个蛋白质中鉴定的 1～3 个肽段通过 TOF/TOF 进行连续轰击。得到的片段离子必须和预测肽段序列相匹配。

2. 未知蛋白质的鉴定

在通过蛋白质数据库鉴定结果不理想的情况下（见 3.3），有些肽段（通常情况是 2～5个）能通过 TOF/TOF 进行分析。从头开始测序结合蛋白质数据库搜索这些肽段离子的 TOF/TOF 离子片段，可能能成功鉴定这些未知蛋白质。搜索鉴定所选数据库应为研究对象所属分类或是种间交叉相关性的物种的蛋白质数据库（见第 20 章中 LC-MS/MS 部分）。

19.4 注　　释

（1）自动化切胶、胶内酶解消化和通过特异液相处理收集目的样品。为了提高通量效率，大规模蛋白质组学设备应该配备自动化处理收集技术，以减少样品在处理过程中受人类角蛋白污染的可能性。

（2）切取蛋白质点面积过大不利于蛋白质的鉴定。因为面积过大会增加化学噪音背景，降低胰蛋白酶在蛋白点中的渗透能力，不利于蛋白酶扩散到蛋白点凝胶中。

（3）双向电泳中，在进行 SDS-PAGE 之前的平衡过程中蛋白质被还原（一般采用 DTT 或 β-巯基乙醇）和烷基化（一般采用碘乙酰胺或碘乙酸）。这样打断了半胱氨酸残基之间的二硫键，从而可防止蛋白质形成二级和三级结构来干扰蛋白质在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移。对于一向电泳分离的蛋白质而言，在胶内酶解之前，必须进行还原和烷基化（见第 22 章）。

（4）由于胰蛋白酶的独特性，使它成为在蛋白质胶内酶解之后用于 MS 鉴定的合适内切酶：

a. 分子质量相对低的内切酶（约 24kDa），用水化缓冲液溶解之后很容易渗透进入冷冻干燥的含蛋白质点的胶粒中。

b. 优良的酶切特性（酶切 K 和 R 的 C 端，如果下一个氨基酸是 P 则不进行酶切，如果 D/E 氨基酸的支链酸性端出现在旁边，则它的酶切效率降低，由于支链的空间效应，如果大量 F/W/Y 氨基酸出现在旁边，则它的酶切效率降低）。商业猪胰蛋白酶用 N-甲苯磺酰-L-苯基丙氨酸氯甲基酮（TPCK）进行了处理从而避免非特异性胰蛋白酶的活性。

c. 在分子质量 600～4000Da 中，由于氨基酸 K 和 R 的存在，通过胰蛋白酶作用，产生了大部分的蛋白酶水解肽段，这和高分子质量精确的 MALDI-TOF-MS 兼容。

d. 商业猪胰蛋白酶赖氨酸侧链进行了甲基化还原处理，这样可减少自切肽段，但是在 842.5099Th 和 2211.1046Th 的两个信号强的离子峰能用于质谱内的校正

平衡。

e. 蛋白酶水解肽段很容易就能质子化（并且在质谱分析中产生很好的信号），是因为肽段的两个基本位点，一个位于肽段 N 端，一个位于最后 C 端氨基酸（K 或 R）的支链上。此外，这个特性在 ESI 质谱中非常有用，通过 MS/MS 能够得到主要双电荷形式，从而产生有用的 b/y 离子片段系列（确定的电荷片段：见第 25 章）。

(5) 对于特需目的（如为了增加蛋白质的覆盖率），采用同样的方案，也可以使用其他蛋白内切酶。

a. Chrymotrypsin 在 F/W/Y 后进行酶切，产生更多、更短的片段。

b. Endo Lys-C 在 K 后进行酶切（对 R 不进行酶切）。

c. 蛋白酶 V8 在 DE 或 E 后进行酶切（取决于酶切消化缓冲液的 pH 范围）。

(6) 推荐在冰上配置胰蛋白酶酶液并且放置在冰上使酶液充分渗透进入蛋白质胶粒中，这样可减少胰蛋白酶的自切作用。

(7) 在 37℃下酶解消化 3h 以上，以过夜为最长酶解时间。过夜消化最为方便。对于长时间消化（如过夜），酶切消化过程可以直接在室温下进行而不用放在 37℃的环境中。这样可以减少胰蛋白酶自切峰产生的信号。

(8) 在干燥胶粒的方法中，其目的是为了获得均匀的小结晶。长时间结晶会产生大结晶，相反快速结晶会得到较小的结晶。为了掌握结晶过程并且不改变其组分，胶粒可在真空状态或温箱中加热（30～40℃）干燥几分钟。

(9) 一些 MOLDI-TOF 质谱仪的制造商已经开发出了预制的疏水/亲水点样板（如 Bruker Daltonics 的 AnchorChipTM 技术）。这些点样板能使样品精确放置并且在点样板上进行浓缩，因此离子信号强度的灵敏性能提高 5～20 倍。同时认真仔细清洗点样板很重要，这样能防止外来污染（主要是塑化剂引起的污染）浓缩在点样孔中。胶内酶解后的肽段可以直接在点样板上点样（见 3.1.1 节），或通过肽段抽提和浓缩后再点样。

(10) 从质谱分析的角度看，能否得到可信的蛋白质鉴定结果有两点很重要：

a. 质量的精确度［理想的情况应低于 30ppm（1ppm＝10-6，后同），通过仔细认真的光谱内参校正，如今的 MALDI-TOF 质谱仪已经能达到 10～15ppm］。

b. 检测尽可能多的离子灵敏性来增加序列覆盖率。

(11) 通过精确的运算法则，光谱的注释一般是自动完成的。但是如果蛋白质的鉴定是失败的，那么应该对注释进行检查并修改它到：

a. 如果双向电泳的蛋白点含有一个或两个可鉴定的蛋白质，最多选择 40 个信号最强的离子峰（如两个蛋白点具有相近的表达模式）。

b. 最小的信噪比为 3∶1。

(12) 对于信号强的质量光谱，低信号的离子注释会降低蛋白质的鉴定率，因此在大多数强信号蛋白质特异肽段离子中，离子信号低于 2%的应排除。

(13) Promega 公司生产的测序级猪胰蛋白酶的主要已知自解峰是：842.51、870.54、1045.56、1940.94、2211.10、2225.12、2239.14、2283.18、2299.18 和2807.31。在网站 http：//prospector. ucsf. edu/ucsfhtml4. 0/misc/trypsin. htm 上可以查询到完整的胰蛋白酶自解峰。

（14）我们推荐对已知的污染物同时进行注释（如非植物角蛋白峰），在第一步数据库搜索步骤中同时对这些污染物进行注释，然后精确鉴定这些污染物后再过滤这些污染物所产生的峰值。事实上，角蛋白水解峰（如 1475.74Th）可能有不同的角蛋白亚类（如角蛋白 10 和角蛋白 2），其他角蛋白水解检测到的特异峰属于这些亚类中的一类或几类。

（15）室内授权的搜索引擎（如 Mascot）：

a. 允许特异或所有蛋白质数据库的安装。

b. 保留一些研究所需的机密性。

c. 搜索时间不受网速和远程服务器忙碌程度的限制。

d. 允许批量搜索。

e. 允许所有搜索结果没有时间限制进行存档。

（16）搜索引擎网址链接：

a. Mascot：http：//www.matrixscience.com/cgi/search _ form.pl? FORMVER=2&SEARCH=PMF

b. MS-Fit（protein prospector）：http：// prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/ms-fit.htm

c. ProFound：http：//prowl.rockefeller.edu/profound _ bin/WebProFound.exe

d. Peptide search：http：//www.mann.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearch/Services/PeptideSearch/FR _ PeptideSearchFormG4.html

e. PepMAPPER：http：//wolf.bms.umist.ac.uk/mapper/

f. Aldente：http：//www.expasy.org/tools/aldente

（17）单独的序列覆盖信息理解起来有局限性，它还部分依赖于预测蛋白质的分子质量。对于一个高分子质量的预测蛋白质而言，低序列覆盖度可能表明：

a. 胰蛋白酶无法完全进入此蛋白质的某些部分。

b. 此蛋白质包含很少的胰蛋白酶酶切位点［如富含脯氨酸蛋白（proline-rich proteins，PRP)］，所以酶切肽段过大以至于质谱分析中无法检测到（超出了质量检测范围）。

c. 肽段离子化竞争效应使某些肽段无法离子化。

d. 用于胶内酶解的蛋白点仅是这个预测蛋白质的一部分。

e. 所搜索的蛋白质数据库中没有准确包含胶内酶解蛋白点的序列（突变或翻译后修饰，但是更典型的序列多态性的原因是种间交叉）。

另一方面，对于低分子质量的预测蛋白质，高序列覆盖率可能就完全表明在数据库中记录的此蛋白序列太短，从而导致序列覆盖率不正常地过高。

对于这些原因，通过对匹配肽段在蛋白质序列中的位置进行再次比对确认要比要比序列覆盖率合适得多：匹配肽段是否从头到尾都位于蛋白质序列上（这可能表明预测的有效性）？或者相反，它们的部分序列位于蛋白质序列上（如果它与胶内分子质量和等电点一致，这可能表明仅鉴定到了一个蛋白质降解片段）？

（18）在单向凝胶电泳中，多个并联蛋白质可能在挖胶过程中同时被挖取出来。如果发生这种情况，那么我们必须选择合适的数据库进行搜索（见第 22 章）。

（19）大量的可变修饰搜索参数使搜索时间延长并会产生非特异性蛋白质鉴定结果。如果这些可变修饰搜索参数对于搜索过程是必要的，我们推荐限制其他搜索参数（如较低的质量误差、对物种的分类进行更精确的描述和设置丢失的酶切位点数目不存在）。

参 考 文 献

1. Karas M., Bachman D., Bahr U., and Hillenkamp F. (1987) Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 53–68.
2. Karas M. and Hillenkamp F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 2299–2301.
3. Karas M., Bahr U., Ingendoh A., and Hillenkamp F. (1989) Laser desorption/ionisation mass spectrometry of proteins of mass 100,000 to 250,000 Dalton. *Angewandte Chemie Int. Ed.* 760–761.
4. Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., and Whitehouse C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 64–71.
5. http://nobelprize.org/chemistry/laureates/2002/index.html.
6. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., and Yoshida T. (1988) Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 151–153.
7. *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant. *Nature* 796–815.
8. Jensen O., Wilm M., Schevschenko A., and Mann M. (1999) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels, in *Methods in Molecular Biology: 2-D Proteome Analysis Protocols*, vol. 112 (Link, A. J., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 513–530.
9. De Hoffmann, E., Charette, J., and Stroobant, V. (1999) *Spectrométrie de Masse, Cours et Exercices Corrigés*, 2ème édition. Dunod, Paris.
10. De Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2002) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.
11. Throck Watson, J. (1997) *Introduction to Mass Spectrometry*, 3rd ed. Lippincott-Raven: New York.
12. James, P. (ed.) (2000) *Proteome Research: Mass Spectrometry (Principles and Practice)*. Springer Verlag, New York.
13. Cotter, R. J. (1997) *Time-of-Flight Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Biological Research*. American Chemical Society, Washington, DC.
14. Vestal M. L., Juhasz P., Hines W., and Martin S. (1998) in *Proceedings of the 46th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Orlando, FL.

第20章　利用纳升级液相色谱-串联质谱进行蛋白质鉴定

Luc Negroni

摘要　串联质谱是根据肽段的裂解规律（fragmentation pattern，也叫做 MS/MS 扫描）对肽段进行鉴定的有效技术。在串联质谱中，每一个肽片段都可以获得各自的光谱，从而可以根据肽段的特性对蛋白质进行鉴定。这个在自动采集数据方面的重要优势给液相色谱和串联质谱建立了有效的联系，而纳升级色谱柱和电喷雾电离的使用可大大增加该方法的有效性。利用这种技术现在可以大量鉴定出飞摩尔（fentomole）水平的肽段。MS/MS 光谱的批量处理可以产生一系列肽段，这些肽段对鉴定纯蛋白或蛋白质混合物具有较高的可信度。

关键词　串联质谱；MS/MS；nanoLC；肽段分析；蛋白质鉴定；EST 数据库

20.1　前　　言

蛋白质组学分析是一个多步骤的过程，通常涉及蛋白质的提取、分级、分离和质谱鉴定。分离蛋白质的首选是二维电泳。胶内消化、纯化的蛋白可以利用 MS 或 MS/MS（串联质谱）得到的肽段进行分析、鉴定。如果已知物种的基因全序列，则通常使用基质辅助激光解吸质谱法电离飞行时间（MALDI-TOF）的 MS 光谱技术来进行分析。它是一种高通量鉴定蛋白质的方法，而且也不需要纯化肽段。另外，尽管 MS/MS 分析比较费时，但可以在没有数据库（从头测序）情况下识别单个肽段。理论上，利用 MS/MS 鉴定出的一个肽段就可足以找到相应的蛋白质，而实际上利用 MS 鉴定蛋白则至少需要 4 个或 5 个肽段和肽质量指纹图谱（peptide mass fingerprinting）。在只有不完整的序列数据库［如只有表达序列标签（EST）数据库］或只有其他物种的保守序列用于识别时，MS/MS 具有较大的便利性。与二维电泳相比，提出了另外一种简单水解蛋白质混合物的方法而不需要分离蛋白质：利用多维液相色谱（LC）和 MS/MS 用于分离复杂混合物和识别数千条多肽片段[1-3]。这两种方法之间，中间的方法是使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺（SDS-PAGE）凝胶电泳分离部分蛋白质和利用 LC-MS/MS 进行蛋白质鉴定[4-6]。

蛋白质组学的 MS/MS 主要采用配备一个电喷雾源的离子阱（IT）和四极杆飞行时间（Q-TOF）仪器。电喷雾是利用质谱仪的金属喷针（needle）和入口之间的电位差而产生的。这会导致喷针出口处的液滴带电。液滴蒸发成细小的喷射流后，质谱仪根据质荷比（m/z）可以检测离子（带电肽段）。在 Q-TOF 质谱仪中，第一个样品池将电喷雾源的离子转移到四级杆中。四级杆设置传输一个离子（前体离子）到碰撞池。在碰撞池

中，前体离子进行裂解。裂解碎片（裂解离子）在另一个质量分析器（TOF管）中进行分析。由于碎片是沿着肽段骨架裂解的，因此氨基酸序列可根据碎片离子扫描（MS/MS扫描）进行测定。在离子阱（IT）质谱仪中，离子的选择、片段裂解和片段分析都是在同一池子（离子阱）进行的。实际上，MS/MS仪器可以进行MS和MS/MS之间的切换。当离子选择和碎片裂解关闭时，MS就可以进行扫描。MS扫描可以检测所有的肽段离子和进行片段裂解。

电喷雾对无机盐非常敏感，因此肽段样品上样之前必须进行脱盐处理。最有效的一种方法是使用反相高效液相色谱法（RP-HPLC）。反相高效液相色谱法不仅可以去除盐类，而且还可以纯化和浓缩肽段样品。这就是为什么液相色谱-MS/MS（LC-MS/MS）是蛋白质组学中最常见的配制。由于电喷雾技术跟样品浓度高度相关，色谱柱的直径是主要参数，减少柱子的直径可以提高灵敏度[7]。目前用直径50～100μm的纳米级色谱柱来提高质谱仪进样口的肽段浓度。此外，利用纳米级色谱柱将流量减少到150～300nl/min也可以提高电喷雾的有效性[8]。

在过去的十几年中，nanoLC-MS/MS技术已被广泛使用。在大多数质谱实验室，它已成为一种普遍的技术。由于电喷雾电离（ESI）不同于MALDI电离过程，因此分析出的肽段结果有所不同。这些差异可以解释为什么nanoLC-MS/MS是MALDI-TOF质谱分析的一个有效补充[9,10]。

20.2　材　　料

20.2.1　胰蛋白酶消化

（1）天然聚丙烯聚合酶链反应（PCR）的12联管（0.2ml/管）和相应的冷冻贮存盒架子（VWR International，Fontenay-sous-Bois，France）。

（2）多通道移液枪（VWR International）。

（3）Eppendorf Repeater分液器和Combitips分液管（VWR International）。

（4）Eppendorf热混合器Thermomixer（Eppendorf，Le Pecq，France）和用于加热联管的模块加热块（VWR International）。

（5）修饰胰蛋白酶（Promega，Madison，USA）母液（200ng/μl）。

（6）脱色液：10%乙酸的40%甲醇（用dH_2O配制）。

（7）清洗液：50mmol/L NH_4HCO_3（用dH_2O配制，母液1mol/L）。

（8）消化缓冲液：25mmol/L NH_4HCO_3，20%甲醇（用dH_2O配制）。

（9）收缩液：100%乙腈。

（10）萃取液：0.5%三氟乙酸（TFA），40%乙腈，10%甲醇（用dH_2O配制）。

20.2.2　高效液相色谱仪（NanoLC）

（1）NanoHPLC终极系统：Famos-Switchos-Ultimate（Dionex-LC Packings，France）。

（2）C18反相柱：300μm × 5mm（trap column）和75μm × 10cm（analytical column；PEPMAP C18，Dionex LC-Packings）。

(3) 流体管路接头（fitting）和管路（tubing）(Upchurch)。

(4) 熔融石英管（Upchurch)。

(5) 样品溶液：0.1%TFA，2%乙腈（用 dH_2O 配制)。

(6) 装载溶剂（清洗捕获柱子，7μl/min，见图 20-1)：0.1%甲酸，0.02%TFA，2%乙腈。

(7) 高效液相色谱溶剂 A：0.1%甲酸，2%乙腈（用 dH_2O 配制)。

(8) 高效液相色谱溶剂 B：用 95%乙腈和 5%dH_2O 配制的 0.1%甲酸。

20.2.3　质谱仪（离子阱）

(1) 纳米级喷针 360/20/10，未加涂层（New Objective，Woburn)。

(2) 离子阱质谱仪，LCQ XP Plus（Thermo Electron，Courtaboeuf，France)。

(3) 数据采集软件，Xcalibur1.3（Thermo Electron)。

(4) 数据处理软件，BioWorks3.1（Thermo Electron)。

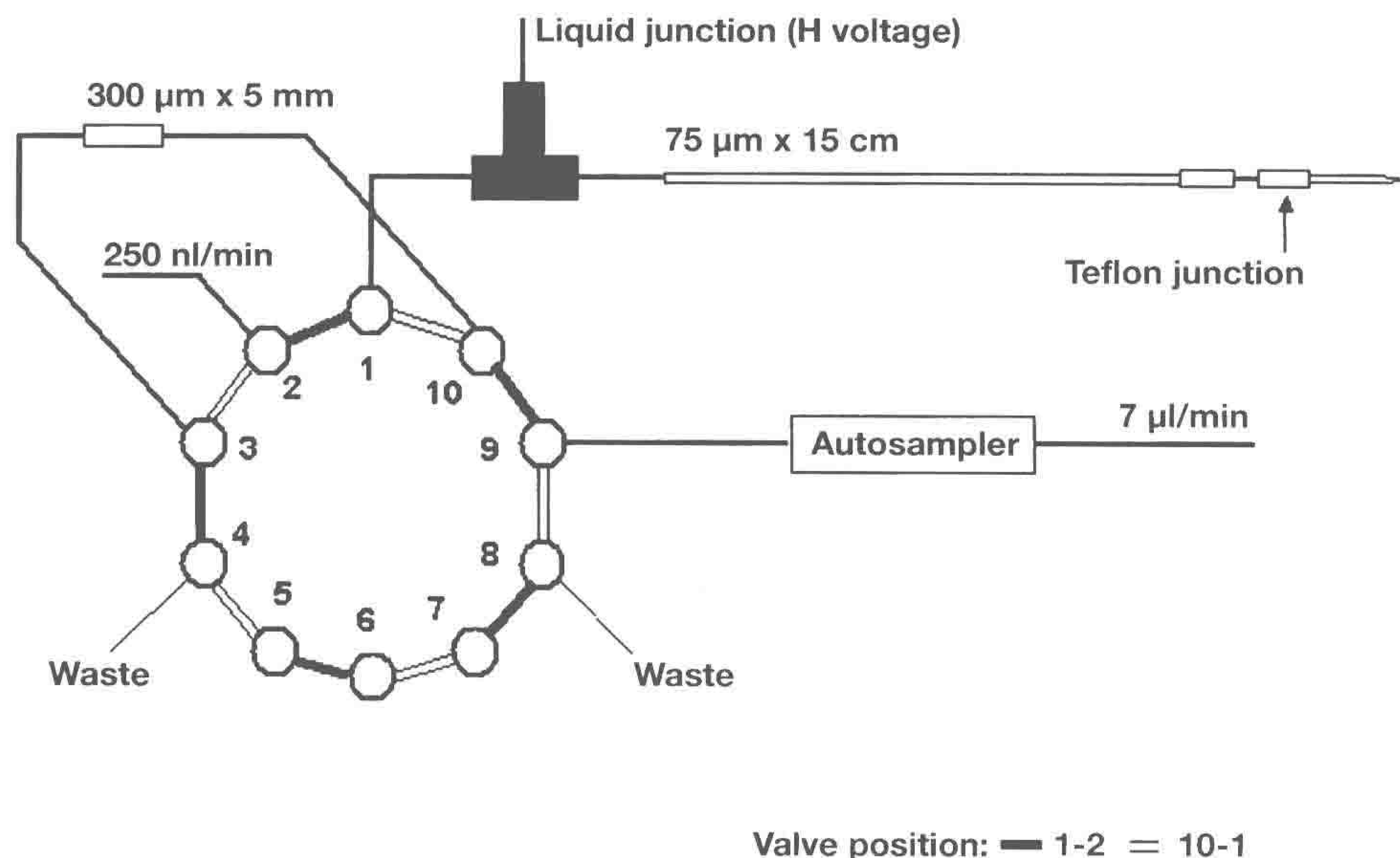


图 20-1　开关阀上的系列柱子示意图

通过富集柱和 75μm 柱之间的液体接头可以得到一个完备的系统。柱子作为一个过滤器，防止针头堵塞。在这个位置上，液体接头不会降低色谱的分辨率。一个直径 20μm 的小管放置在柱子和喷针之间以保护柱子。1—2 和 10—1 对应阀门的两个位置，分别用作上前置柱（precolumn）的装载样品和反相过柱洗脱（back-flush elution)

20.3　方　　法

20.3.1　胶内蛋白的水解和多肽的提取（一天的实验方案）

对于从 SDS-PAGE，2D-PAGE，BN-PAGE 电泳（经考马斯亮蓝 G-250 染色）得到的

蛋白质[11]，这个方案是可行、有效的。它不需要使用自动酶切仪（digestion robot）。使用多通道移液枪和微孔板格式，一天可以处理 96 个样品。标准的方法不需要对蛋白质进行还原和烷基化反应。这两个反应步骤比较花时间，但是对大部分的蛋白质鉴定没有影响，即使使用 SDS-PAGE 和 BN-PAGE 得到的样品。但根据我们的实验，这两个反应步骤似乎是角蛋白污染的一个重要来源。然而，在富含半胱氨酸的情况下，蛋白质的还原和烷基化可能会增加蛋白质的覆盖率（见注释 1）。多通道的移液枪用于去除不同的液体，Eppendorf 分液器用来分配溶液。蛋白质的还原和烷基化均须在 37℃与搅拌情况下进行。

（1）将凝胶切块（直径 1.5mm）放入管子中。非液体凝胶可以在 4℃存放数周，也可以在－20℃存放几个月。用油漆胶带进行密封。

（2）脱色：用 50μl 脱色液处理 2×30min。

（3）清洗：用 50μl 洗涤液清洗 15min。

（4）收缩：用 50μl 收缩液处理 15min。

（5）清洗：用 50μl 洗涤液清洗 15min。

（6）收缩：用 50μl 收缩液处理 15min。

（7）收缩：用 50μl 收缩液处理 15min。

（8）将胶条夹置于冰上 10min 后，加入 5μl 胰蛋白酶（20ng/μl 酶解缓冲液），静置 10min。然后将胶条夹置于热混合器上 4h。经胰蛋白酶酶解 2h 后添加 5μl 酶解缓冲液，以弥补液体的挥发。

（9）提取 1：添加 15μl 提取液，等待 15min。转移提取物。

（10）提取 2：加 15μl 乙腈，等待 15min。转移提取物。

（11）干燥：在室温下蒸发过夜或使用 Spped VAC 干燥 30min（见注释 2）。

可选步骤：还原和烷基化

（1）用 10mmol/L（1.5mg/ml）DTT 和 55mmol/L（10mg/ml）碘乙酰胺（IAA）（溶在 50mmol/L NH_4HCO_3）处理可以进行还原和烷基化。

（2）在 20.3.1 中步骤 4 完成后，添加 25μl 的 10mmol/L DTT。在 56℃下反应 1h。

（3）取出液体，加入 25μl 的 55mmol/L IAA。让反应继续进行，在室温下暗中反应 45min。移去液体，并转到 20.3.1 中步骤 5。

20.3.2 高效液相色谱和 ESI 设置

（1）nanoLC 存在的主要问题是失准或出现坏的管切（tube cutting）。这会导致时间延迟和稀释液体。如果在 75μm 色谱柱和质谱仪之间存在死体积，会出现拖尾效应。如果在 75μm 色谱柱之前存在死体积，则随着保留时间（retention time）增加，肽段会洗脱下来，但不会有严重的色谱退化。

（2）连接前，应用放大镜检查管路两端以确保它们是干净的而且垂直切割的。

（3）图 20-1 给出了配备有 RP 捕获柱和纳米柱的 nanoLC 示意图，将在下面的步骤描述。液体接头是用来提供电压。这种方法可以延长喷针的寿命（见注释 3）。

（4）从自动进样器到捕获柱，使用直径为 50μm 的管子；从捕获柱到开关阀，使用直径 30μm 的管子；从开关阀到分析柱，使用直径 20μm 的管子；从分析柱到喷雾针，

使用直径 20μm 的管子。

(5) 用 TEFZEL 密封垫，TEFZEL 套圈和 PEEK 螺母将毛细管连接到阀门端口（标准端口 1/16 英寸，1 英寸＝2.54cm）。这些配件比不锈钢密封垫圈和螺母压力较低，但在紧固毛细管路时不容易破坏毛细管路。

(6) LC Packings 公司的 nanoLC 柱配备了一个直径为 20μm 的出口管。该管切成 3cm（9nl）。使用一个聚四氟乙烯接头（特氟隆管，直径 300μm）将管连接到纳米级喷雾针，这时缩短至 3cm。这种连接在喷雾针堵塞时不能忍受压力。这个缺点也可能是优点：聚四氟乙烯接头泄漏意味着针尖堵塞，通常跟不规则的喷雾有关。

(7) 使用液体接头（Microtee 连接器）提供电压。根据我们的经验，这是较强的配置。Microtee 放置在 75μm 色谱柱前面，电极为铂丝（见注释 4）。带有液体接头的喷雾针是不加涂层的（外径 360μm，内径 20μm，针头内径 10μm）。

(8) 如果泵装置采用的分流器只能提供一个 nl/min 的流速而没有流速检测器（旧版本的 LC Packings 仪器），则流速必须用连接到 75μm 色谱柱的 25μl 注射器进行检查。LC Packings 系统是 nanoLC，使用了 1∶1000 的分流。泵的流速在 150～250nl/min 的 75μm 色谱柱上应为 150～200μl/min（见注释 5）。

20.3.3 HPLC 分离

(1) 表 20-1 给出一个典型的 250nl/min 速度梯度。该流程还可以优化：如在开始和再生过程中，流速可以为 300nl/min 以减少延误；在肽段检测时，流速可以设置为 200nl/min。这方面的发展在峰值驻留系统（peak packing system）中进行了优化[12]。

表 20-1　HPLC 梯度和阀门位置

时间/min	流速/(nl/min)	%B	阀位置
第1部分	0	250	0 1–2
2.5	250	4	1–2
第2部分			
2.5	250	4	10–1
22	250	20	10–1
27	250	40	10–1
第3部分			
27	250	40	10–1
31	250	100	10–1
37	250	100	10–1
38	250	0	10–1
41	250	0	1–2
50	250	0	1–2

(2) 在第 1 部分，从 0～3min，阀门在位置 1—2（见表 20-1 和图 20-1）。自动进样器注入 5μl 的样品，样品以 7μl/min 的流速加载和捕获于反相前置柱。在第 2 部分的开始，阀门转换到位置 10—1，将捕获柱和 75μm 柱连接起来。然后样品使用反相过柱方

式以 250nl/min 的 nanoHPLC 梯度洗脱。第 3 部分是清洁柱子的再生步骤。

(3) 梯度取决于柱子及其配件。应根据对照如牛血清白蛋白（BSA）的胰蛋白酶酶解产物（100～300fmol 的注射量）进行调整。

(4) 酶解产物溶解在 10～15μl 的含有 TFA 的样品溶液中。TFA 在装载溶剂中作为离子配对试剂，因为与甲酸比较，它可以更好地捕获前置柱上的肽段。另外，甲酸作为高效液相色谱法溶剂 A 和 B 的添加剂，因为 TFA 强烈抑制电离。

(5) 在这些条件下，一个完整的流程需要 45～50min。图 20-2 是一个色谱图的例子，该图来自于一个复杂的多肽混合物。在 11～35min 洗脱肽段。MS 基峰图类似于紫外图谱，借此可以检验分离的效果和质量。MS/MS 扫描的 TIC 显示了在多肽分离的范围内具有很高的信噪比。

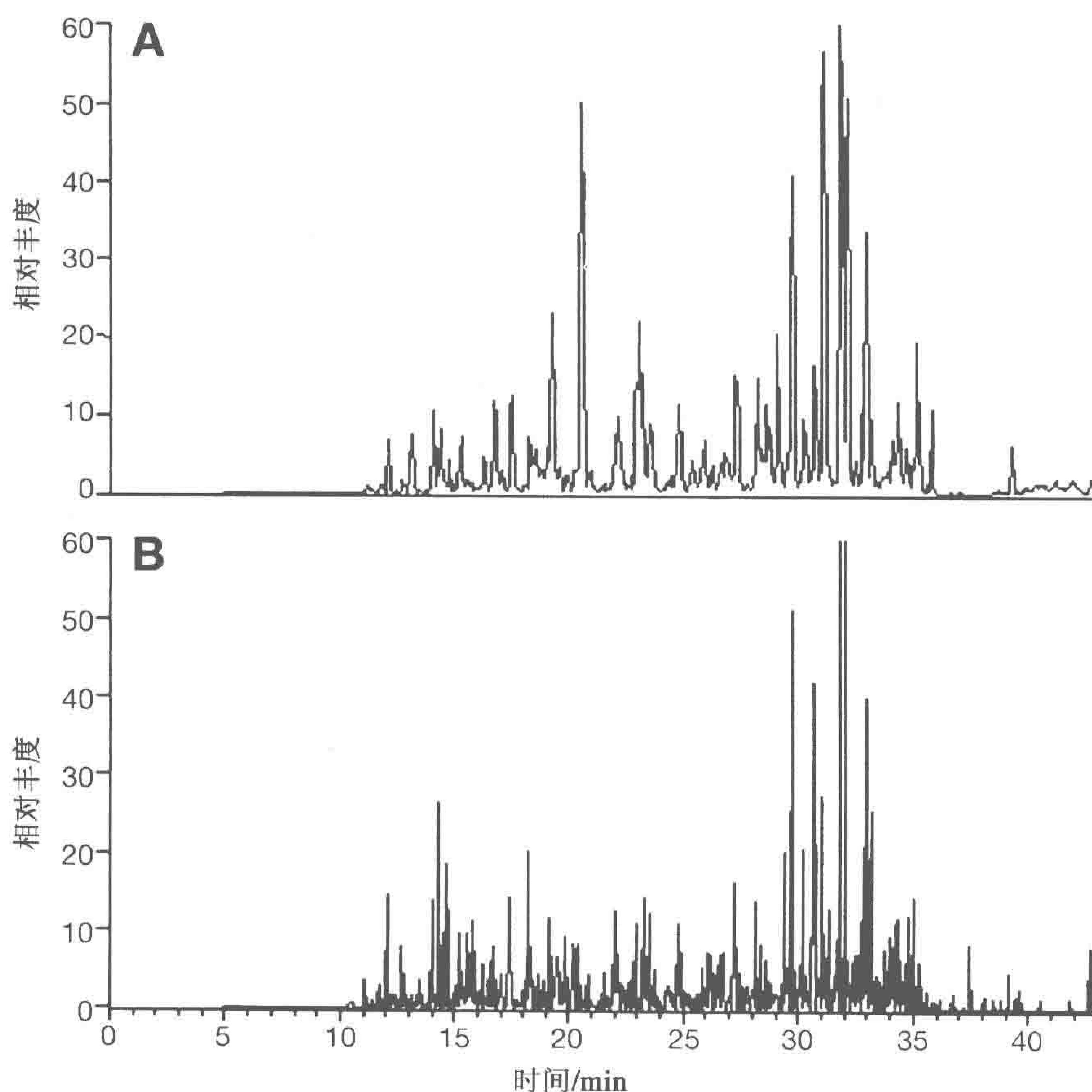


图 20-2　nanoLC-MS/MS 色谱的一个范例

A. MS 基峰图谱。该图说明了强度最高的离子在不同 MS 扫描中的强度。每个峰值对应于一个或几个肽段的洗脱。B. 对应这些 MS/MS 扫描的总离子流图（TIC）。在这个例子中，在进样后 11～35min，多肽片段洗脱下来。最后一个峰是柱再生和阀门转换时产生的假象

20.3.4　质谱仪设置

(1) 利用 nanoLC，只需 10～40s 就能将多肽样品洗脱下来。因此，仪器在不到

10s 内就能完成一个循环（在 MS 模式和相关 MS/MS 扫描的一个核查扫描，摄入 survey scan）。这里所描述的一些步骤，虽然是专门针对带有软件 Xcalibur 1.3 的 LCQ IT，但主要原理对于所有的 MS/MS 仪器来说都是相同的：MS/MS 是数据依赖性，即在 MS 模式中若检测到了一个数据峰，MS/MS 就会自动采集数据。

（2）Xcalibur 一个高效的采集方法是“Nth”法。这种方法是一个连续的 3 次扫描：①全质谱扫描（m/z 350～1900）；②变焦扫描（ZoomScan）（扫描两个主要的具有较高分辨率的离子）；③这两个离子的 MS/MS（见注释 6）。

（3）液体接头处的电离电压设置为 1.2～1.6kV。如果需要增加超过 160kV 的电压，一般表明喷针或缓冲液出现了问题。在这种情况下，首先更换纳流喷雾针，并用 1.3kV 对其进行测试。如果问题仍然存在，则变换缓冲液（见注释 7）。

（4）LCQ 仪器的裂解参数 Q_Z 为 0.22，活化时间为 50ms，碰撞能量为 35%～45%。Q_Z 从 0.25 降低至 0.22，意味着在 MS/MS 扫描中可以检测更小质量的肽段（见注释 8）。

（5）动态排除法可以用来防止对同一离子进行连续的 MS/MS 分析（见注释 9）。

（6）排除列表是用来避免噪声分析。一些聚硅氧烷离子通常会出现在质量为 371Th、445Th 和 462Th[13]。

（7）采用 LCQ IT、“Nth”法和 50min 的采集时间，得到的原始文件大小大约是 12Mo。

20.3.5　数据处理和解析

（1）数据分析是一个具有 3 个步骤的过程。

a. 第一步，从原始文件中提取 MS/MS 谱图并进行筛选。

b. 第二步，与从挑选的序列数据库中获得理论 MS/MS 谱图进行比较。对于一个实验 MS/MS 图谱，父本离子的质量是用来从数据库中提取“同量异位的（isobaric）”的肽段。如果使用特定的酶如胰蛋白酶，只有那些具有特异性而能产生同量异位的肽段，才可以从数据库中提取出来。然后该软件根据裂解规则和 Roepstorff 和 Fohlman 提出的注释将 MS/MS 理论图谱中的肽段序列进行转换[14]。

c. 最后一步，是进行实验图谱与从序列数据库中获取的不同系列图谱之间的相关性分值的计算。这里的数据分析采用了 BIOWORKS 软件（以前为 Sequest）。在这个软件中，相关性分值称为 XC。

（2）与埃德曼（Edman）测序相反，鉴定的序列不是基于连续氨基酸的实际检测。如果数据库中没有完全一致的序列用于查询，则不可能进行肽段识别。而且，肽段识别是基于与已知序列的相关性进行的。与其他的算法类似，BIOWORKS 采用了得分制从而给出每个 MS/MS 谱中最可能的肽段[15,16]。这意味着一个错误的肽段序列也可能成为备选序列，这会导致错误的蛋白质鉴定。为了减少这个错误的发生，应当至少用两个 MS/MS 谱图去识别同一蛋白的两个肽段。

（3）一般用已经测序的模式物种的蛋白质数据库来鉴定蛋白。对于其他物种，EST 重叠群数据库也是合适的（见注释 10）。在一些 FTP 站点可以获得蛋白质数据库和 EST 数据库（见注释 11）。

（4）数据库可以使用一个数据库的索引调整法进行预处理。此功能可以使查询时间

减少 10 倍。不幸的是，索引调整固定了裂解的特异性和授权的质量修饰。如果选择索引调整数据库，可设置蛋氨酸氧化（+16）为一个可变修饰（即蛋氨酸可被认为是氧化的）（见注释 12）。

（5）MS/MS 谱图是根据 TIC 的强度和时间范围的时间间隔来提取的。如果在 20～40min范围洗脱肽段，则使用这些数值作为时间范围内的参数。必须按照正确 MS/MS 图谱的最小 TIC 来设置 TIC 强度（LCQ 通常为 $1\times10^5\sim5\times10^5$）。MS/MS 提取可以产生 50～200 MS/MS 图谱。

（6）大规模样品数据采集可以在批量模式下进行样品处理。安装有 BIOWORKS 的电脑（Pentium®4 处理器和 512 MB DDR SDRAM 内存）利用 SWISS-PROT 数据库进行比较时，每个谱图需要 1～2s。进行 nanoLC 分析得到结果需要 1～2min。

（7）首先，使用 SWISS-PROT 数据库。该数据库可以检查角蛋白污染和胰蛋白酶肽段，库中包含了注释好的序列。

（8）其次，使用特定的植物数据库。如果使用 EST 数据库，软件将会翻译成蛋白质数据库。设置翻译码（frame of translation）为 6 个可能性（三个正向和三个反向翻译码）。

（9）不同样品的对应结果都会存储在样品名称目录中。选择 Multiconsensus result 可以获取结果。

（10）根据 XC 的临界值 1.4～1.7，2～2.5 和 2.5～3（分别对应带有 1 个、2 个和 3 个电荷的肽段）来筛选肽段鉴定。一些错误的肽标识也会保留在列表中。它们通常是一些嘈杂的光谱。这就解释了只有两个 MS/MS 光谱用于识别时为什么需要人工检查的原因。

（11）删除那些只有一个 MS/MS 图谱鉴定出的蛋白质。如果蛋白质是用两个 MS/MS 谱图鉴定的，人工检查一下实验谱图中强度最大的峰有没有用于匹配。

（12）如果“没有酶”选择作为查询参数以及胰蛋白酶用来酶解消化，检查候选肽段是否真的是胰蛋白肽段。此检查似乎是相关标准，应毫不含糊地验证识别。

（13）表 20-2 是一个 BIOWORKS 简要输出的例子，是二维凝胶的蛋白点在胶内胰蛋白酶消化后进行 nanoLC-MS/MS 分析结果。nanoLC-MS/MS 运行过程中产生的数百个 MS/MS 谱图，有足够强度可用来提取和用于数据库查询的还不到 100 个。用于查询的 EST 数据库没有索引，也没有酶的特异性，蛋氨酸氧化被认为是可变的。采用 XC 阈值来过滤肽段鉴定（XC 幅度高达 1.5、2 和 3）。通过筛选的 19 个 MS/MS 图谱被确认为是胰蛋白肽段（表 20-2）。没有指定某种酶进行搜索时，已鉴定肽段 C 端的赖氨酸或精氨酸参加增加了匹配的可信度。电荷值是父本离子的电荷。大多数的胰蛋白肽段带有两个电荷。然而，三个单电荷离子可识别具有显著 XC 值的肽段，并确认出双电荷获得离子的鉴定结果（肽段 DTGLFGVYAVAK）或识别新的肽段（IDAVDASTVK 和 VTEEDVIR）。每个 MS/MS 谱图与几个肽段相关，但只有第一命中率的列在表 20-2。ΔC_n 是第一与第二命中率之间相关性的差值（XC_1-XC_2）/XC_1，该值应大于 0.1。离子的数值是 MS/MS 图谱中实验离子的数目，与从肽序列预测的理论离子相匹配。例如，18/22 表明，在计算出的 22 个离子中，MS/MS 谱含有 18 个。在肽段序列，M^* 对应蛋氨酸亚砜；蛋氨酸氧化后（+16）的部分序列为 ILVANTAMDTDK 和 VLFGGG-VVPEMVMAK。

表 20-2　利用 EST 数据库中进行“蛋白质鉴定”的简要输出示例

File,Scans(s)	Sequence	MH+	Charge	XC	Delta Cn	Ions
#1 GPI:C:432431| Maize cDNA interbank contig						
dv02010302n045,1812-1817	DSFLDEGFILDK	1398.68	2	4.684	0.507	18/22
dv02010302n045,1202-1207	GASEHVLDEAR	1312.61	2	3.800	0.541	16/22
dv02010302n045,1319-1329	IHPM*TIIAGYR	1287.69	2	2.123	0.394	14/20
dv02010302n045,1357-1362	IIAHGNCFVNR	1413.74	2	3.480	0.416	18/22
dv02010302n045,1219-1222	ILVANTAMDTDK	1307.66	2	4.033	0.522	18/22
dv02010302n045,1309-1314	ILVANTAM*DTDK	1291.66	2	3.410	0.497	20/22
dv02010302n045, 1444-1447	SDLM*NIAM*TTLSSK	1543.74	2	3.000	0.375	16/26
dv02010302n045, 1209-1224	SLHIDNPAAK	1065.57	2	2.812	0.270	15/18
dv02010302n045,1317-1324	VEIDITCAPR	1173.59	2	3.846	0.333	17/18
dv02010302n045,1402-1407	VIEEIM*IGEDR	1319.66	2	4.052	0.574	16/20
dv02010302n045,1637-1642	VLFGGGVVPEM*VM*AK	1553.76	2	3.618	0.525	15/26
dv02010302n045,1749-1752	VLFGGGVVPEMVM*AK	1537.76	2	3.051	0.499	18/26
#2 GPI:C:435461| Maize cDNA interbank contig						
dv02010302n045,1657-1662	DTGLFGVYAVAK	1240.66	2	3.987	0.546	19/22
dv02010302n045,1664-1669	DTGLFGVYAVAK	1240.66	1	2.323	0.393	14/22
dv02010302n045,1212-1217	IDAVDASTVK	1018.54	1	1.945	0.388	13/18
dv02010302n045,1527-1532	IPTPELFAR	1043.59	2	2.699	0.234	14/16
dv02010302n045,1377-1372	LSTDPTTTNM*LVAK	1507.77	2	2.812	0.462	12/26
dv02010302n045,1439-1442	RIPTPELFAR	1199.69	2	2.965	0.365	13/18
dv02010302n045,1204-1242	VTEEDVIR	960.50	1	2.400	0.299	10/14

20.4 注　释

(1) 建议以一系列代表性的样品在加或不加DTT/IAA情况下验证还原和烷基化反应的效率（或无效性）。检查已鉴定肽段的数量，角蛋白的污染，和是否存在羧胺甲基化半胱氨酸（+57Da）。

(2) SpeedVac会导致颗粒和干燥蛋白的溶解性减小，降低肽段的回收率。30μl的提取物在室温下需要过夜蒸发或在4℃蒸发1～2天。

(3) 液体接头应紧固耐用，足以运行数百个样品而不会有任何问题（在堵塞的情况下除外）。

(4) 液体接头的电极丝必须抗氧化。可以使用电泳仪用的铂金线。

(5) 分流是一种有效的方法，可以减少泵、泵管、混和器的死体积。另外，流速取决于来自分流管（nanoLC系统的一般为10μm内径）和柱子的压力。这些压力的任何变化都会改变流速。利用活动分流系统可以改善这一性能。

(6) 在m/z大范围进行全质谱扫描是“低分辨率”扫描。在m/z短范围内（10m/z集中在父本离子）进行变焦MS扫描是“高分辨率”扫描。这种扫描可以测定肽段的电荷和质量。这里为MS/MS选择了两个离子。选定离子的数量取决于肽段的洗脱时间、肽段混合物的复杂性、每次扫描的速度以及仪器的灵敏度。对于复杂混合物，不使用MS ZoomScans，增加选定离子的数量（最多5个）。这就会增加待分析肽段的数量。

(7) 纳流喷雾源安装摄像头，可以让用户看到喷头和喷雾，便于调整和故障排除。当LC泵开始运行接通电压后，液滴必须喷出，喷头上不能有任何液体。

(8) 在http://www.abrf.org/ABRFNews/1996/September1996/sep96iontrap.html可找到有关IT和Q_z对去除低质量的影响较为全面的教程。

(9) 动态排除列表中对应的是父本离子的质量，这些是在最后几秒钟检测得到的。这可以防止对相同的父本离子进行重复MS/MS扫描。此外，这种设置还可以分析共洗脱时流出的低丰度的离子。

(10) EST是DNA序列（一般含200～500个核苷酸），是在系统地对cDNA文库的两端进行测序时所产生的。EST重叠群是EST簇的共有序列。单一序列是跟任何EST没有相似性的EST。EST重叠群和EST单一序列通常分组；相应的数据库称作假定独立基因（tentative unique genes，TUG）。TUG=TUC+TUS。TUC和TUS分别是假定独立重叠群（tentative unique contigs）和假定独立单一序列（tentative unique singlets）的缩写。

(11) 参见IPI（国际蛋白索引）ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/IPI/current/。新的标准有最新数据库：ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/和植物的蛋白序列数据库：http://www.plantgdb.org/download.php 。

(12) 选择修改变量会增加索引数据库的大小，延长查询时间并降低相关性得分。除了蛋氨酸氧化外，在第一轮查询时不必修改任何变量，以降低鉴定假象。

(13) 在MS/MS分析中，角蛋白和胰蛋白酶肽段的少量污染不算什么问题。只有

当它们的峰是最强的峰时才成为难题，在这种情况下感兴趣的肽段对应的小峰，可能会被屏蔽而不能分析。

参考文献

1. Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R. 3rd. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19,** 242–247.
2. Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., et al. (2003) Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2,** 413–425.
3. Lin, D., Tabb, D. L., Yates, J. R. III (2003) Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Bioch. Biophys. Acta* **1646,** 1–10.
4. Ferro, M., Salvi, D., Brugiere, S., et al. (2003) Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana. Mol. Cell. Proteomics* **2,** 325–345.
5. Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., and Raikhel, N. V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell.* **16,** 3285–3303.
6. Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., et al. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell.* **16,** 478–499.
7. Abian, J., Oosterkamp, A. J., and GelpÌ, E. (1999) Comparison of conventional, narrow-bore and capillary liquid chromatography/mass spectrometry for electrospray ionization mass spectrometry: practical considerations. *J. Mass Spectrom.* **34,** 244–254.
8. Wilm, M. and Mann, M. (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem.* **68,** 1–8.
9. Bodnar, W. M., Blackburn, R. K., Krise, J. M., and Moseley, M. A. (2003) Exploiting the complementary nature of LC/MALDI/MS/MS and LC/ESI/MS/MS for increased proteome coverage. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14,** 971–979.
10. Lim, H., Eng, J., Yates, J. R. 3rd, et al. (2003) Identification of 2D-gel proteins: a comparison of MALDI/TOF peptide mass mapping to mu LC-ESI tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14,** 957–970.
11. Schagger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199,** 223–231.
12. Davis, M. T. and Lee, T. D. (1997) Variable flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the comprehensive analysis of complex protein digest mixtures. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **8,** 1059–1069.
13. Schlosser, A. and Volkmer-Engert, R. (2003) Volatile polydimethylcyclosiloxanes in the ambient laboratory air identified as source of extreme background signals in nanoelectrospray mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **38,** 523–525.
14. Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* **11,** 601.
15. Yates, J. R. 3rd, Eng, J. K., and McCormack, A. L. (1995) Mining genomes: correlating tandem mass spectra of modified and unmodified peptides to sequences in nucleotide databases. *Anal. Chem.* **67,** 3202–3210.
16. Eng, J., McCormack, A. L., and Yates, J. R. III. (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5,** 976–989.

第 21 章　水稻叶片和根蛋白质的纳升级二维液相色谱串联质谱

Linda Breci 和 Paul A. Haynes

摘要　本章我们介绍运用 2D 液相色谱串联质谱大规模鉴定水稻叶片和根组织中的蛋白质的详细实验方法。该方法通过带有电喷雾发射喷器的纳升级流速双相层析柱（强阳离子交换/反相）来实现，这种技术的缩写名为 Mudpit（多维蛋白鉴定技术）。这里介绍的实验方法包括从水稻植株收集叶片和根组织材料，从收集的叶片和根组织材料中提取蛋白质，提取出来的蛋白质的消化，制备带有整合电喷雾发射喷头的双相毛细管层析柱，运行数据依据性二维液相色谱-串联质谱分离多肽，使用数据库搜索得到的串联质谱数据鉴定多肽和蛋白质。这个方法不仅适用于多种植物材料，而且可用于鉴定植物特定组织、器官、细胞器或亚细胞器的蛋白质。本章除了介绍详细的实验方法外，还列举了一个具有代表性实验的结果，即用多维蛋白鉴定技术鉴定超过 1000 个的从水稻叶片和根样品中提取的蛋白质。

关键词　纳升级液相色谱串连质谱；二维纳升级层析；多维蛋白鉴定技术（Mudpit）；植物蛋白质分离提取；水稻叶片；水稻根

21.1　前　　言

应用于复杂的肽复合物分离和鉴定的纳升级 2D 液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）技术的发展，是近年来蛋白质组学领域最重要的进展之一[1,2]，这种技术通常被称为多维肽段鉴定技术（Mudpit）[3]。该方法首先将复杂的蛋白混合物用一种蛋白酶（如胰蛋白酶）消化成一组大小不一的肽段混合物，然后用相互垂直的二维液相色谱分离这个肽段混合物，用这种二维液相色谱技术分离肽混合物不是各相液相色谱分离组分的简单算术总和，而是根据肽在各相液相色谱中的迁移特性，最终获得分离的肽产物组分[4,5]。

这个方法的优势是它不会有在 2D 蛋白凝胶电泳中常发生的由于蛋白质的极端大小，疏水性以及等电点等方面造成的偏差，而且这个方法可以在相对较短的时间内对于给定的样品获得大量的蛋白质鉴定数据。但是，这个方法也存在一些缺点，如技术要求高，重复性不好，因此它不适合分析蛋白表达量差异微弱的两个样品。最近有研究报道[6,7]，通过利用 N^{15} 代谢标记生物体，如酵母和大肠杆菌，进行多维蛋白定量分析两个细胞状态间的蛋白质表达的变化。但是，这种方法只能用于能被 N^{15} 代谢标记的生物体上，因此不适用于植物组织。

Mudpit 这个术语最初被用于描述一种非常特别的实验设计；这个实验使用一根带有一

个整合纳米电喷头，并填装强阳离子交换和反相物质的双相熔融石英毛细管层析柱。随后的报告中将这个术语用于描述几乎任何涉及双向色谱层析分离的所有实验体系。许多这种实验体系涉及大量的连接部分，死区容积和组分收集（伴随着固有的损耗），因此它们对肽段和蛋白的层析分离和鉴定的效率均不如传统的方法。因此，人们转而使用多种填装有离线双层析柱系统的二维色谱来分离肽段和蛋白，然而，用 Mudpit 分析来表述这些二维色谱系统事实上是不准确的。由于这些二维色谱系统在组分收集时不可避免的损耗，以及蛋白质附着于大孔径层析系统的巨大表面上，这些二维色谱系统需要大量的蛋白质样品来做实验。相对于其他材料来说，植物蛋白质组学研究仍然处在相对较早的发展时期。在撰写本文的时候，我们简单搜索“proteomics”关键词，可以从美国国家生物技术信息中心（NCBI）Pubmed 出版物数据库中检索到 4704 篇文章，但是简单搜索“plant proteomics”关键词，却只能检索到 260 篇文章，这意味着在所有的蛋白质组学研究中，大约 95％是在植物以外的其他物种中开展的。最近发表的大多数文献仍然是在用质谱鉴定蛋白质之前，依赖于双向凝胶电泳来分离蛋白。但是，有关非双向凝胶方法使用的报道在不断增加，如离线双向液相色谱分离[8]，十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离[8-10]，蓝绿非变性胶分离[11]，溶剂分馏[10]，运用二维纳升级液相层析柱进行的 Mudpit[12]。

新技术在植物蛋白质组学研究领域的应用还受到一些客观因素的限制。首先是相对较少的植物基因组序列信息，水稻[13-15]和拟南芥[16-18]是迄今为止公布基因组序列信息的植物。当然，这种现象很快将得到明显的改善，如玉米[19]的完整基因组测序工作已经开始。

植物蛋白质组学关注的另一个问题是：植物组织的样品制备要比细菌或者人类体液这种样品的制备更加困难。植物组织包含大量的维护细胞结构的细胞壁蛋白和多糖，叶绿体光合作用蛋白以及可能是这个星球上最丰富的重要代谢蛋白质——核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶（RuBisCo）。在含有许多低丰度蛋白的样品里存在少数高丰度蛋白将会为蛋白质分析带来较大的困难，特别是在 Mudpit 分析中，这些高丰度蛋白占用仪器宝贵的分析时间，降低分析混合物中其他肽段和蛋白质的成功率。植物组织材料还带来一个实际操作的问题，即从植物材料中抽提蛋白质一般采用液氮研磨，然后用三氯乙酸和丙酮沉淀[20]，结果得到一种含有蛋白质和大量难溶物质的浅棕色的纤维物质。用 Mudpit 方法很难从这种纤维物质中抽提出足够的蛋白质，分析前的反复抽提倒是可以解决这个困难。

尽管有这么多的问题，Mudpit 分析依然是一种能在较短的时间内获得大量的蛋白质鉴定信息的最好方法之一。将来更多的植物基因组序列信息将有助于应用 Mudpit 分析技术对任何植物组织材料的表达蛋白质组进行归类，以及应用纳升级气质联用 LC-MS/MS 进行蛋白质跨物种鉴定。尽管小麦基因组序列数据非常少，但我们此前通过利用水稻基因组序列信息[15]，结合运用这种分析方法，成功地分析了小麦中的淀粉体[9]。需要特别指出的是，基质辅助激光解吸电离（MALDI）肽段收集指纹谱识别技术只能用来鉴定大多数熟知的蛋白，鉴定未知蛋白的成功率很低[21]，因此，这样的实验必须用 MS/MS 技术鉴定未知的肽段。

此外，还有一点需要重视的是，植物拥有相当大的基因组，如水稻拥有超过30 000个的基因，这意味着它有较大的潜在蛋白表达区域。就算最好的 Mudpit 分析系统也只能在一个实验中鉴定 1000～1500 个蛋白质，所以一个 Mudpit 分析实验对植物组织材料来说，还不能认为是个全面的蛋白质组学分析。更多的蛋白表达和鉴定信息还是要通过柱切换多维分离技术获得，如在用 Mudpit 分析蛋白质组分之前先根据分子质量和电荷的差异分离蛋白质组分，或者先用 SDS-PAGE 或等电聚焦方法[22]分离蛋白质，然后再用纳升级液质联用系统，气质联用系统[23, 24]或其他一些类似的综合系统分析蛋白质。

本章节阐释毛细管双相 Mudpit 系统在分析水稻叶和根的蛋白提取物中的应用，从植物幼苗开始，详细介绍具代表性蛋白质的鉴定信息，并对每个分析样品的蛋白质鉴定做了总结。

21.2 材　　料

21.2.1 仪器设备

（1）串连质谱：离子阱串联质谱仪 Thermo LCQ DecaXP Plus（Thermo Electron，SanJose，CA）。

（2）纳喷雾离子源：美国亚利桑那大学 Chemistry Department Machine Shop 制造，也可用 Thermo Electron，New Objectives 公司（Woburn，MA），或者 Brechbuehler 公司（Houston，TX）的商业产品。

（3）Surveyor 自动进样器（Thermo Electron 公司）。

（4）Surveyor 微管径高效液相色谱（Thermo Electron 公司）。

（5）P2000 激光加热型微电极拉制仪（Sutter Instrument 公司，Novato，CA）。

（6）氦压柱填充室（Brechbuehler 公司，Houston，TX）。

（7）特氟隆管压力室，1/16 英寸至 0.4mm（Chromatography Research Supplies 公司，Louisville，KY）。

（8）SpeedVac 真空干燥浓缩机（Savant Instruments 公司，Farmingdale，NY）。

（9）涡旋振荡仪（Barnstead 公司，Dubuque，IA）。

21.2.2 HPLC 缓冲液和柱子装填材料

（1）缓冲液 A：0.1% 甲酸（98%～100%，EMD Chemical，Gibbstown，NJ）。

（2）缓冲液 B：乙腈，0.1% 甲酸。

（3）缓冲液 C：95% 250mmol/L 乙酸铵，5%乙腈，0.1% 甲酸。

（4）缓冲液 D：95% 1.5mmol/L 乙酸铵，5%乙腈，0.1% 甲酸。

（5）熔融石英：100μm ID × 360μm OD（Polymicro Technologies，Phoenix，AZ）。

（6）反相装填材料：Zorbax™ Eclipse XDB-C18 5μm（Agilent Technologies，Palo Alto，CA）。

(7) 阳离子交换装填材料：Poly Sulfoethyl A™ (PolyLC 公司，Columbia，MD)。

(8) C18 Sep-Pak 固相抽提柱（Waters，Bedford 公司，MA)，一只 10ml 一次性塑料注射器。

(9) 9Spec-Plus PT C18 固相移液器吸头（Varian 公司，Lake Forest，CA)。

21.2.3　化学试剂、缓冲液、溶液和酶

(1) Milli-Q 水（18MΩ 电阻)。

(2) 叶片重悬液：用丙酮配制 10%三氯乙酸（TCA)，0.07% (*V/V*) 巯基乙醇。

(3) EDTA 漂洗液：用丙酮配制 0.07% (*V/V*) 巯基乙醇（Sigma，St. Louis，MO)，2mmol/LEDTA (Sigma，St. Louis，MO)。

(4) HPLC 级乙腈（EMD Chemical)。

(5) HPLC 级甲醇（EMD Chemical)。

(6) 用水配制 0.1%甲酸溶液。

(7) 用 90%乙腈配制 0.1%甲酸溶液。

(8) 100mmol/L 碳酸氢铵溶液。

(9) 100mmol/L 氯化钙溶液。

(10) Proteomics 级的胰蛋白酶（Sigma：10mmol/L 盐酸配制浓度为：1μg/μl)。

(11) 内切赖氨酸-C 蛋白酶（Roche Diagnostics，Indianapolis，IN)：10mmol/L 盐酸中配制 0.2μg/μl。

(12) 乙醇（EMD Chemical)。

(13) 三氯乙酸（EMD Chemical)。

(14) 丙酮（EMD Chemical)。

(15) 尿素（Bio-Rad，Hercules，CA)。

21.3　方　　法

21.3.1　叶片和根组织的取材以及蛋白质沉淀

(1) 从植物的中部切取未衰老的绿色叶片，立即放入自封塑料袋中冷冻。如果没有冷冻设备，可先放在冰上，然后再放到−20℃保存。

(2) 挖出植物根系，在绿色茎段以下一英寸的地方取材。抖动根系，并快速的依次放入 3 个大烧杯中洗去土壤，然后再放入自封塑料袋中冷冻，或暂时保存在冰上。

(3) 称取 2.5g 去除了茎秆和其他物质的冰冻叶片和根系，用预冷的剪刀剪碎样品后，放入预冷的陶瓷研钵中，加液氮研磨至粉末，需要多次添加液氮，以保持组织的冰冻状态。

(4) 把冰冻的叶片或根系粉末放入 40ml 离心管中，加入 25ml 叶片重悬液，振荡混合，确保所有的粉末被重悬起来后，在−20℃下静置 45min，再振荡摇匀，35 000g 离心 15min。

（5）用玻璃移液管吸去上清液，注意不要扰动沉淀。用等体积的 EDTA 洗液洗涤沉淀。振荡打散沉淀，冰上静置 5min，35 000*g* 离心 15min。重复操作至少两次，直到叶片蛋白质沉淀不再有绿色。

（6）冰冻干燥沉淀物，得到含有蛋白质、细胞壁和纤维的淡褐色材料。

21.3.2 从三氯乙酸/丙酮沉淀的粉末中制备蛋白质样品

（1）针对每个样品，分别称取 20mg 的三氯乙酸/丙酮沉淀粉末（制备方法见 21.3.1）放入有盖的 1.5ml 离心管中。

（2）在每只管中加入 1ml 的 100mmol/L Tris-HCl（pH8.5），涡旋振荡 1min，18 000*g*离心 10min，弃上清液（见注释 1）。

（3）在每只管中加入 500μl 的 8mol/L 尿素，涡旋振荡 5min，超声波水浴处理 10min，然后旋转振荡 30min。

（4）18 000*g* 离心 10min，将约 400μl，含蛋白质浓度为 0.1～0.5μg/μl（见注释 2）的上清液移至另一只管中。

（5）用 8mol/L 尿素重复第 3 和第 4 步骤，合并上清液，调整容积到 600μl。

21.3.3 抽提蛋白质的蛋白酶消化

（1）在总容积为 600μl 的蛋白抽提液中添加 5μl 外切赖氨酸蛋白酶工作液，在旋转振荡器上 37℃消化过夜（见注释 3）。

（2）在每个样品中分别加入 2300μl 的 100mmol/L 碳酸氢铵，30μl 的 100mmol/L 氯化钙，60μl 的乙腈，10μl 的胰蛋白酶工作液。终浓度为：1.6mol/L 尿素，76mmol/L碳酸氢铵，1mmol/L 氯化钙，2%（*V/V*）乙腈，3.3ng/L 胰蛋白酶。

（3）在旋转振荡器上 37℃消化 24～48h。添加 60μl 甲酸使终浓度为 2%，将样品保存在－20℃备用。

（4）用 15ml 含有 0.1%甲酸的 90%乙腈溶液平衡 C18 Sep-Pak 层析柱，然后用 20 ml 含有 0.1%甲酸的双蒸水清洗柱子 4 次。

（5）吸取 3ml 蛋白酶消化液加样到已平衡好的 C18 Sep-Pak 层析柱上，收集流出的液体，再重复慢速过柱两次。用 20ml 含有 0.1%甲酸的双蒸水洗柱子，洗脱盐及其他松散结合物质。再用 3ml 含有 0.1%的甲酸的 90%乙腈溶液将肽段从 C18 Sep-Pak 柱上洗脱下来。

（6）用真空干燥浓缩机将上述洗脱液浓缩到约 500μl。16 000r/min 离心 10min，如果还有沉淀，取上清液，去沉淀。继续用真空干燥浓缩机浓缩样品到 50μl，用含有 0.1%甲酸的双蒸水稀释到 200μl。

（7）用 300μl 含有 0.1%甲酸的 90%乙腈溶液平衡 C18 Spec-Plus 固相萃取移液器吸头，然后用 300μl 含有 0.1%甲酸的双蒸水冲洗 5 次。

（8）吸取 200μl 肽段溶液加样到已平衡好的 C18 Spec-Plus 固相萃取移液器吸头上，收集流出的液体，再重复慢速过柱两次（见注释 4）。用 300μl 含有 0.1%甲酸的双蒸水冲洗柱子 5 次，然后用 300μl 含有 0.1%甲酸的 90%乙腈溶液将肽段洗出。

(9) 用真空干燥浓缩机将上述洗脱液浓缩到约 10μl，此溶液可直接上样到双相 Mudpit 层析柱。

21.3.4　制备带喷雾发射器的二维（SCX/RP）纳升级高效液相色谱层析柱

(1) 层析柱的制备：将一根长 25cm，内径为 100μm，外径为 360μm 熔融石英毛细管推入一个激光拉制仪中，留一截 3～8μm 的熔融石英毛细管头部。这样它既可以用作离子源针头，也可用作连接到质谱仪进样口的层析柱[25]。

(2) 将装有悬浮在甲醇溶液里填充材料的微型离心管放入压力室中，并盖好盖。将毛细管的钝头用金属箍与上盖拧紧相连，深度与填充物质一致，拧紧金属箍后，气室加压到 500psi,，将悬浮在甲醇溶液中的填充材料推入到层析柱中，当填充材料被装填到毛细管的 3～8μm 的尖头时，甲醇通过柱子流向其顶部，在毛细管中先装入 4cm 强阳离子交换（SCX）填充物，然后再装入 8cm 反相层析（C-18）填充物。

(3) 用 PEEK T 形管连接器将填充好的柱子与高效液相色谱（HPLC）连接，这个 T 形管连接器的金线电极（与质谱仪的高压电源相连）为层析柱上游提供电压，与柱子的洗脱溶液形成液相连接。

(4) 用 HPLC 缓冲液 B 洗层析柱 1h，流速为 1μl/min，使柱体填充物完全填实。

(5) 在使用前，用 HPLC 缓冲液 A 平衡柱子 1h，流速为 1μl/min。

21.3.5　二维纳升级高效液相色谱分离肽段

柱切换分离是一种在线分离方法，通过 HPLC 缓冲液连续洗脱双相柱，使洗脱液进入质谱仪，以确保在上样、盐洗脱和冲洗柱的过程中不丢失样品。第一相根据电荷性质分离肽段，第二相是根据疏水特性分离肽段。

(1) 将 10μl 样品注入 10μl 自动进样环中，完成将肽段加载到强阳离子（SCX）柱床上（见注释 5）。

a. 用 5%缓冲液 B 以 1μl/min 的流速注入进样环，将肽段推入自动进样环中，这个过程大约需要 25min。

b. 然后将液流速度降至 400nl/min，注入 35min，将样品全部推入，并冲洗柱子。

c. 通过阳离子交换介质的任何肽段将结合到反相介质上，任何通过这两个树脂介质的肽段都将在质谱仪中被检测和破碎，全部的运行时间大约需要 70min。

(2) 用 5%～50%的缓冲液 B 以 400nl/min 的速度反相梯度洗脱 60min。然后再用 50%～98%的缓冲液 B 梯度洗脱 5min，并用 98%的缓冲液 B 洗脱 5min，这样，残留的肽段都将被洗脱下来。用 5%缓冲液 B 快速（1min）冲洗柱子，然后增加冲洗流速到 1μl/min 冲洗柱子 24min，重新平衡柱子，全部运行时间为 95min（见注释 6）。

(3) 用 250mmol/L 乙酸铵溶液逐步增加浓度洗脱 SCX 柱子 4min，每次盐洗脱后都要伴随着反相梯度洗脱（见步骤 2 中描述的），使离子交换介质中的多肽转移到反相介质中。那些松散结合在柱子上的肽段可在低浓度的缓冲液 C 中被转移，而结合紧密的肽段则需要更高浓度的缓冲液 C 或缓冲渡 D。

a. 首先用 5%的缓冲液 B 洗脱 5min，流速为 400μl/min。

b. 用 X%的缓冲液 C 洗脱柱子 4min，第一次盐洗脱中，X=10%。

c. 用 5%的缓冲液 B 洗脱柱子 7min，然后用 5%～50%缓冲液 B 的反相梯度洗脱 60min。

d. 用 50%～98%缓冲液 B 梯度洗脱柱子 5min，再用 98%缓冲液 B 洗脱 4min 后，残留的肽段将被洗脱下来。

e. 用 5%缓冲液 B 快速冲洗柱子，然后，增加到 1μl/min 的流速持续冲洗 24min，重新平衡柱子。

f. 之后用不同百分浓度（X=20、30、40、50、60、70、80、90、100）的缓冲液 C 分步洗脱柱子，每 10 步洗脱时间为 105min。

（4）当 250mmol/L 乙酸铵溶液盐洗脱结束后，最后一步盐洗脱是用 50%的缓冲液 D 代替前面提及的 X%缓冲液 C，以确保将所有紧密结合在 SCX 柱上的肽段转移到反相介质上。快速梯度变化洗脱以及用 98%缓冲液 B 洗脱 20min 可最大限度地将紧密结合在反相介质上的肽段洗脱下来。全部的运行时间为 105min。表 21-1 显示了步骤 3 和步骤 4 的层析过程。

21.3.6 运用 Thermo Electron 公司的高效液相色谱-离子阱质谱联用仪 LCQ Deca XP Plus 进行数据依赖性串联质谱分析

（1）仪器基本参数：质谱检测扫描范围：m/z 400～1500；5 次显微扫描，进样时间：500ms，质谱信号灵敏度：1×10^5；裂解分离选择宽度：2.7Da；肽段的默认携带电荷值：MS/MS=2；喷雾电压：1.8kV；动态排除：7min 窗口，重复计数=2，记录时间=0.5min；排除质量：低值=0.8amu，峰值=1.5amu；碰撞能量归一化=35%，激发 Q 值=0.25，碰撞时间=30ms；选择 3 个最强的离子按照 n=3、2、1 的顺序用于裂解。

（2）使用这些参数设置，当程序设定读取从层析柱上洗脱下来的肽段的串联质谱信号，质谱仪就会连续不断地获得前面所述的 HPLC 中贯穿 13 个步骤的数据。动态排斥是为了确保肽段的丰度，以及与其相关的同位素没有被重复裂解，从而最大限度地分散选择裂解的不同肽段离子。

21.3.7 利用数据检索鉴定蛋白质

将无法阅读的串联质谱图谱在蛋白质序列数据库上检索比对，用以鉴定经蛋白酶消化后的肽段，用这些肽段的鉴定信息组装成蛋白质鉴定信息。

（1）用下列软件程序之一，将全套串联质谱在适当的蛋白质序列数据库中进行检索：Sequest（Thermo Electron 公司）[26,27]，Mascot（Matrix Sciences 公司，London，UK）[28,29]或 Xtandem（开放软件，可从马尼托巴蛋白质组学中心获取 http：//www.proteome.ca/opensource.html）[30,31]。

表 21-1　Mudpit 分析中使用的层析步骤

步骤	缓冲液 C 浓度/%	缓冲液 D 浓度/%	乙酸铵浓度/(mmol/L)	具体描述
1	0	0	0	初始等度加样
2	0	0	0	初始乙腈梯度
3	10	0	25	第一步盐洗脱
4	20	0	50	第二步盐洗脱
5	30	0	75	第三步盐洗脱
6	40	0	100	第四步盐洗脱
7	50	0	125	第五步盐洗脱
8	60	0	150	第六步盐洗脱
9	70	0	175	第七步盐洗脱
10	80	0	200	第八步盐洗脱
11	90	0	225	第九步盐洗脱
12	100	0	250	第十步盐洗脱
13	0	50	750	高盐洗脱，加入乙腈延伸梯度

(2) 在大多数生物样品的制备过程中存在许多的内源蛋白酶，所以在消化过程中也会出现非胰蛋白酶消化肽段。因此，最好在搜库设置参数时，不要特别指出全胰蛋白酶解肽段，这样可以避免明显的信息丢失。

(3) 肽段鉴定数据需要排序和筛选，去除尽可能多的无关信息。遗憾的是，没有一种明确设定的标准能够保证从数据检索程序中输出的所有肽段是正确的，也无法排除不正确的肽段。一篇阐述数据检索参数的综述文章将告诉人们，在这个问题上几乎没有统一的意见。最好的办法是，在相同的实验室，使用相同的仪器设备，用已知的蛋白质消化样品，优化和改进一套公布的参数。肽段判断的准确性也可以通过搜索统计显著性评估[32,33]或通过重复检索一个反相蛋白序列数据库[31,34,35]来得以改善。

(4) 一个仍存在争议的问题是，Mudpit 数据报告是否列入基于单一肽段鉴定的蛋白鉴定。一般情况下 Mudpit 实验中大约有一半的蛋白质鉴定是根据单一肽段信息鉴定出来的，所以这是一个很重要的需要考虑的问题。当然，一些蛋白质鉴定是非常准确的，因为一个小的蛋白质可能只有一个可用的胰蛋白酶水解肽段，或者一些修饰遮蔽了其他肽段的鉴定，或者虽然有许多胰蛋白酶水解的肽段产生，但是只有一个被正确地选择去裂解。此外，以单一肽段为基础的蛋白质鉴定可以在大多数 Mudpit 数据库中获得。数据库检索参数的微小变化会严重地影响搜索结果，产生假阳性鉴定的几率很高。蛋白质鉴定最好要报告基于两个或更多个肽段鉴定信息的蛋白质数量，以及两个不同的图谱包含单个肽段鉴定的数量[36](见 21.3.8)。

21.3.8 结果举例：从成熟水稻中制备的叶片和根系组织的Mudpit分析

1. 植物的生长和收集

水稻（*Oryza sativa*，cv. Nipponbare）种子种在温室中，每天光照12h，控制12h光照温度为29℃，12h黑暗温度为21℃，维持30%湿度，植物生长在含有50%Sunshine混合土和50%硝基腐殖质土的小盆中，萌发50天后取叶片和根材料。

2. 蛋白质抽提、样品制备和Mudpit分析

用研钵将叶片和根在液氮中研磨成粉末。用TCA/丙酮法抽提蛋白质（方法见21.3.1），用3.2和3.3的方法消化抽提得到的蛋白质，肽段混合物按照3.4～3.7中描述的方法进行分析。

3. 质谱数据库检索与分析

所有串联质谱数据比对搜索NCBI的公共资源中的一个水稻蛋白序列数据库，同时辅以一个包括胰蛋白酶、胞内蛋白酶赖氨酸-C、角蛋白、白蛋白、酪蛋白及其他普通实验室污染物的内在污染物文件。

用Xtandem软件检索数据，并用蛋白质组学全球分析机器网络工具（www.thegpm.org）来分析数据。Xtandem软件检索参数的设置：碎片离子单一同位素质量误差：0.5Da；母离子单一同位素质量误差：2.0±Da；频谱动态范围：100；频谱总峰：50；最大有效阈值> 0.1。氧化作用引起的16Da的甲硫氨酸可变修饰是可以接受的。

4. 用Mudpit分析水稻叶片和根的实验结果

表21-2～表21-4显示了Mudpit分析水稻叶片和根的实验结果。每个实验鉴定出来的蛋白总数列在表21-2中；分为3类：两个或更多个鉴定肽段；两个或更多个鉴定肽段或为一个预值小于0.001的鉴定肽段；预值小于0.1单个或多个鉴定肽段。这些鉴定蛋白质数量又被分为根和叶共有的，以及它们各自特有的几类。表21-2还包括了每个实验中检索到的MS/MS频谱数量的信息，以及上文描述的在每个分类项中肽段的数目。

表21-2 用Mudpit分析方法鉴定水稻叶片和根蛋白质数量的总结

项　目	叶（51 443频谱）	根（39 673频谱）	非冗余数	叶和根共有	叶特有的	根特有的
总蛋白数（两个或多个肽段）	340（7245肽段）	303（3143肽段）	549	83	246	220
总蛋白数（两个或多个肽段，或一个高分值的肽段）[a]	340（7007肽段）	332（2937肽段）	579	93	247	239
总蛋白数（两个或多个肽段）[b]	578（6996肽段）	578（2908肽段）	1005	111	467	427

a 高分值的单一肽段是指最大预值为0.001。

b 一个已鉴定的单一肽段是指最大预值为0.1。

表 21-3 Mudpit 分析鉴定的前 25 个水稻叶片蛋白质，根据蛋白质预值排序

序号	鉴定蛋白	肽	Log(e)(蛋白)	等电点(pI)	M. Wt/kDa
1	NP_039391.1|核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶长链[Oryza sativa]	2140	−233.2	6.22	52.8
2	NP_920971.1| 推测的 rbcL；来自 10 染色体叶绿体的 RuBisCO 大亚基	2061	−244.9	6.45	52.9
3	NP_918587.1| 推测的光合系统 II 33kDa 氧化 进化蛋白 evolvingprotein [Oryza sativa]	124	−59.3	6.08	34.8
4	NP_922436.1| ATP 酶 α 亚基 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	108	−85	5.95	55.1
5	NP_039390.1|ATP 合成酶 CF1β 亚基 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	94	−66.8	5.47	54
6	NP_920964.1|推测的来自 10 染色体叶绿体的 ATP 酶 α 亚基	93	−70	5.88	55.7
7	NP_920970.1|推测的 ATPB：来自 10 染色体叶绿体的 ATP 酶 β 亚基	91	−63.3	5.38	54
8	NP_917149.1|碳酸酐酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	68	−62.5	8.41	29.1
9	XP_474199.1| OSJNBa0011F23.15 [Oryza sativa]质体谷胱甘肽合成酶	58	−49.4	5.96	46.6
10	XP_475868.1|推测的 ATP 合成酶 CF1β 亚基	57	−62.2	5.95	58.9
11	NP_911136.1|可能是光合系统 II 氧化进还蛋白复合前体 2	49	−56.6	8.66	26.9
12	XP_470174.1| 推测的过氧化氢酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	48	−39	8.21	62.5
13	XP_478362.1|推测的细胞壁富含甘氨酸结构蛋白前体 1	44	−157.7	9.02	26.9
14	XP_467296.1| 磷酸核酮糖前体[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	44	−27.4	5.68	44.8
15	XP_478627.1|推测的 3-1 氧化进化增强蛋白;叶绿体前体	43	−52.7	9.8	22.6
16	XP_472744.1| OSJNBa0036B21.24 [Oryza sativa]3 磷酸甘油醛脱氢酶	41	−61.5	7.61	42.7
17	XP_474191.1| OSJNBa0011F23.7 [Oryza sativa] 核酮糖-1,5-二磷酸羧化活性酶	37	−13	6	49.1
18	NP_916596.1| 推测的苷氨酸脱氢酶 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	34	−58.6	6.51	111.4
19	XP_475256.1| 推测的 ATP 合成酶 β 链 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	34	−34.8	5.66	43
20	XP_475055.1|推测的 peptidylprolyl 异构酶 (EC 5.2.1.8) [Oryza sativa (japonica)]	33	−34.4	9.36	26.6
21	NP_039445.1|光合系统 I 亚基 VII [Oryza sativa]	33	−21	6.52	8.9
22	NP_917525.1| 推测的叶绿素 a/b 结合蛋白 2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	33	−18.1	5.29	27.7
23	NP_915665.1|推测的类枯草芽孢杆菌异构酶 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	29	−32.1	8.72	78.8
24	XP_462797.1|推测的三磷酸异构酶 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	29	−31.2	5.38	27
25	XP_462851.1| B1146F03.16 [Oryza sativa]类叶绿体蛋白 12 (CP12)	25	−16.5	4.58	12.8

表 21-4　Mudpit 分析鉴定的前 25 个根蛋白质，根据蛋白预值排序

序号	鉴定蛋白	肽	M. Wt/kDa	等电点(p*I*)	log(e)(蛋白)
1	NP_909830. 1|糖-UDP 糖基转移酶 2[Oryza sativa]	123	5. 94	92. 8	−118. 7
2	XP_475868. 1|推测的 ATP 合成酶 β 链[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	98	5. 95	58. 9	−100. 8
3	XP_466582. 1|推测的 3 磷酸甘油醛脱氢酶(磷酸化)				
4	XP_472949. 1|细胞质 3 磷酸甘油醛脱氢酶 OJ000223_09. 15 [Oryza sativa]	78	7. 69	36. 5	−60. 3
5	NP_920013. 1|推测的烯醇酶(2 磷酸化 D 甘油酸水解酶) [Oryza sativa (japonica)]	72	6. 34	36. 7	−59. 2
6	XP_479895. 1|胞质，3 磷酸甘油醛脱氢酶[Oryza sativa (japonica)]	64	5. 16	45. 9	−87. 1
7	XP_470632. 1|推测的非共生血色素 1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	58	6. 61	36. 4	−39. 2
8	NP_039391. 1|核酮糖-1，5-二磷酸羧化/加氧酶长链[Oryza sativa]	58	6. 91	18. 4	−34. 2
9	XP_465992. 1|推测的延伸因子 2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	57	6. 22	52. 8	−44. 1
10	NP_912586. 1|GLN1_ORYSA 根的谷胱甘肽合成酶异构酶	54	5. 85	94	−59. 6
11	XP_483191. 1|热激蛋白 82[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	53	5. 73	38. 5	−47. 2
12	XP_462797. 1|推测的 3 磷酸异构酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	45	5. 38	27	−47. 9
13	XP_476473. 1| 推测的病程相关蛋白[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	43	4. 37	19	−19. 5
14	XP_474202. 1| OSJNBa0011F23. 18 [Oryza sativa]推测的丝氨酸/苏氨酸激酶	43	4. 96	27. 3	−19. 5
15	XP_469751. 1|推测的葡萄糖聚酶前体[Oryza sativa]	38	7. 23	67. 7	−47. 2
16	XP_472763. 1| OSJNBa0072F16. 20 [Oryza sativa]14-3-3 蛋白	36	4. 75	29. 8	−39. 3
17	NP_920279. 1|推测的 I 型并成相关蛋白[Oryza sativa (japonica)]	36	9. 1	18. 7	−31. 3
18	XP_475365. 1|推测的热鸡蛋百 70[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	35	5. 1	70. 8	−45. 6
19	XP_483167. 1|乙酰辅酶 A 甲基转移酶[Oryza sativa (japonica)]	34	5. 11	27. 8	−35. 7
20	XP_469569. 1|肌动蛋白[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	32	5. 3	41. 8	−45. 6
21	XP_470658. 1|推测的抗坏血酸过氧化物酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	32	5. 42	27. 1	−34. 1
22	XP_469508. 1|推测的 14-3-3 蛋白[Oryza sativa (japonica)]	32	4. 81	29. 2	−34. 1
23	NP_910962. 1|Gu/Zn 超氧化物歧化酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	31	5. 92	14. 8	−8. 9
24	XP_470141. 1|类热激蛋白 70 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	28	5. 09	71. 3	−44. 5
25	NP_908513. 1|S 腺甘甲硫氨酸合成酶[Oryza sativa (japonica cultivar-group)]	27	5. 22	43. 3	−27. 6

这些实验结果清楚地说明了以下几点。

(1) 在一次实验中，可以从一种植物组织材料中鉴定出数百个蛋白质。

(2) 检索从两个实验中获得的所有超过 91 000 MS/MS 的频谱，运用最低标准，我们在叶片中鉴定出 578 个蛋白质，根中鉴定出 538 个，其中包括 1005 个非冗余蛋白质鉴定。

(3) 运用两个或多个鉴定肽段的更严格的标准后，这些数字分别缩减到 329、303 和 549。

(4) 基于一个鉴定肽段的蛋白鉴定数量占总数的 43%，这与之前公布的数据集相符（或略低于），这些数据集中百分数已被特别报道[12,36-38]。从这两个实验中鉴定出来的蛋白质数量是非常一致的，特别是当不把重复性在 Mudpit 分析技术作为重点考虑 Mudpit 时[39]，但是，鉴定出来的非冗余蛋白质总数显示，在两个数据集中仅有 10%～15%的交叠，这正好说明蛋白质表达的组织特异性。

这些结果中另一个有趣的特征是，虽然在叶和根中鉴定出的蛋白质数量相似，但在叶片中鉴定到的肽段是根中的两倍以上。这是由于从叶片中鉴定出的大量肽段来自 RuBisCo 造成的，如表 21-3 所示。

表 21-3 列出通过 Mudpit 分析，从水稻叶片中鉴定到的前 25 个蛋白质，根据 Xtandem 蛋白质预值排序。表 21-4 列出通过 Mudpit 分析，从水稻根中鉴定到的前 25 个蛋白质，也是按照 Xtandem 蛋白质预值排序。表 21-3 和表 21-4 中列出了在叶和根组织中含量最大的蛋白质，这些蛋白也是这些组织中主要的蛋白质，而且表达量很高。叶片组织中存在许多 RuBisCo、ATP 合成酶、光系统蛋白复合物以及其他几种叶绿体特异蛋白的异构体。根中含有大量碳水化合物代谢酶，如蔗糖-UDP 葡糖基转移酶 2，磷酸丙糖异构酶，抗坏血酸过氧化物酶和三磷酸甘油醛脱氢酶。有趣的是：根中也包含一些可能在对土壤中生物和非生物胁迫响应机制中发挥重要作用的高水平表达病程相关蛋白。

21.4 注　　释

(1) 这个洗涤步骤对于解决由于 TCA 残留而引起的抽提蛋白混合物 pH 过低问题是很有必要的。因为蛋白酶在酸性 pH 下不能发挥最佳功能，所以残留的酸会带来不好的实验结果。

(2) 用标准蛋白定量方法检测抽提蛋白样品的蛋白质浓度。当抽提的蛋白样品浓度过低时，可将多次抽提样品经 TCA/丙酮沉淀后汇总在一起，然后进行蛋白质定量分析。

(3) 虽然胰蛋白酶在 8mol/L 尿素中无活性，但胞内蛋白酶赖氨酸-C 在该条件下依然有活性，该步骤是可选步骤，选择该步骤的理由是，经由赖氨酸-C 消化有助于去除某些 3D 结构，有利于下一步的胰蛋白酶消化作用。

（4）Spec-plus C18 吸头中的液体可在重力作用下流动，但经常会留下一半的液体。在这个吸头上连接一个 3ml 塑料注射器施以很低的压力，就可以重新恢复流动。

（5）这步不需要自动进样器，但是我们实验室的仪器系统配置了自动进样器。样品也可以使用手动注射器或直接通过压力室打进双相层析柱中。

（6）初始 C18 梯度常常含有大量的样品，特别是那些复杂的蛋白质混合物。如果这种情况发生，将 5%～50%的 B 梯度分离时间延长至 90～120min，比本文介绍的 60min 梯度分离，可明显增加更多的蛋白质鉴定数量。

参 考 文 献

1. Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., et al. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **17,** 676–682.
2. Washburn, M. P., Wolters, D., and Yates, J. R. III (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* **19,** 242–247.
3. Haynes, P. A. and Yates, J. R. III (2000) Proteome profiling-pitfalls and progress. *Yeast* **17,** 81–87.
4. Opiteck, G. J. and Jorgenson, J. W. (1997) Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides. *Anal. Chem.* **69,** 2283–2291.
5. Opiteck, G. J., Lewis, K. C., Jorgenson, J. W., and Anderegg, R. J. (1997) Comprehensive on-line LC/LC/MS of proteins. *Anal. Chem.* **69,** 1518–1524.
6. Washburn, M. P., Ulaszek, R., Deciu, C., Schieltz, D. M., and Yates, J. R. III (2002) Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology. *Anal. Chem.* **74,** 1650–1657.
7. Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., Matthews, D. E., and Yates, J. R. 3rd (2004) Metabolic labeling of mammalian organisms with stable isotopes for quantitative proteomic analysis. *Anal. Chem.* **76,** 4951–4959.
8. Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., et al. (2003) Proteomic study of the Arabidopsis thaliana chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *J. Proteome Res.* **2,** 413–425.
9. Andon, N. L., Hollingworth, S., Koller, A., Greenland, A. J., Yates, J. R. III, and Haynes, P. A. (2002) Proteomic characterization of wheat amyloplasts using identification of proteins by tandem mass spectrometry. *Proteomics* **2,** 1156–1168.
10. Peltier, J. B., Ytterberg, A. J., Sun, Q., and van Wijk, K. J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* **279,** 49367–4983.
11. Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmhoner, D., Jansch, L., and Braun, H. P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65,** 1683–1692.
12. Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., et al. (2002) Proteomic survey of metabolic pathways in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99,** 11969–11974.
13. Chen, M., Presting, G., Barbazuk, W. B., et al. (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* **14,** 537–545.
14. Yu, J., Hu, S., Wang, J., et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296,** 79–92.

15. Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* **296,** 92–100.
16. Initiative, A. G. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408,** 796–815.
17. Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., et al.. (2000) Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408,** 820–822.
18. Tabata, S., Kaneko, T., Nakamura, Y., et al. (2000) Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408,** 823–826.
19. Lunde, C. F., Morrow, D. J., Roy, L. M., and Walbot, V. (2003) Progress in maize gene discovery: a project update. *Funct. Integr. Genomics* **3,** 25–32.
20. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7,** 52–54.
21. Porubleva, L., Vander Velden, K., Kothari, S., Oliver, D. J., and Chitnis, P. R. (2001) The proteome of maize leaves: use of gene sequences and expressed sequence tag data for identification of proteins with peptide mass fingerprints. *Electrophoresis* **22,** 1724–1738.
22. Zuo, X., Echan, L., Hembach, P., et al. (2001) Towards global analysis of mammalian proteomes using sample prefractionation prior to narrow pH range two-dimensional gels and using one-dimensional gels for insoluble and large proteins. *Electrophoresis* **22,** 1603–1615.
23. Blonder, J., Hale, M. L., Lucas, D. A., et al. (2004) Proteomic analysis of detergent-resistant membrane rafts. *Electrophoresis* **25,** 1307–1318.
24. Guina, T., Wu, M., Miller, S. I., et al. (2003) Proteomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* grown under magnesium limitation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14,** 742–751.
25. Gatlin, C. L., Kleemann, G. R., Hays, L. G., Link, A. J., and Yates, J. R. 3rd (1998) Protein identification at the low femtomole level from silver-stained gels using a new fritless electrospray interface for liquid chromatography-microspray and nanospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **263,** 93–101.
26. Eng, J., McCormack, A. L., and Yates, J. R. III (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Mass Spectrom.* **5,** 976–989.
27. Yates, J. R. III, Eng, J. K., McCormack, A. L., and Schieltz, D. (1995) A method to correlate tandem mass spectra of modified peptides to amino acid sequences in the protein database. *Anal. Chem.* **67,** 1426–1436.
28. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20,** 3551–3567.
29. Creasy, D. M. and Cottrell, J. S. (2002) Error tolerant searching of uninterpreted tandem mass spectrometry data. *Proteomics* **2,** 1426–1434.
30. Craig, R. and Beavis, R. C. (2003) A method for reducing the time required to match protein sequences with tandem mass spectra. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17,** 2310–2316.

31. Craig, R. and Beavis, R. C. (2004) TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* **20,** 1466–1467.
32. Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., and Aebersold, R. (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75,** 4646–4658.
33. Sadygov, R. G., Liu, H., and Yates, J. R. (2004) Statistical models for protein validation using tandem mass spectral data and protein amino acid sequence databases. *Anal. Chem.* **76,** 1664–1671.
34. Peng, J., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Licklider, L. J., and Gygi, S. P. (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: the yeast proteome. *J. Proteome Res.* **2,** 43–50.
35. Elias, J. E., Gibbons, F. D., King, O. D., Roth, F. P., and Gygi, S. P. (2004) Intensity-based protein identification by machine learning from a library of tandem mass spectra. *Nat. Biotechnol.* **22,** 214–219.
36. Breci, L., Hattrup, E., Keeler, M., Letarte, J., Johnson, R., and Haynes, P. A. (2005) Comprehensive proteomics in yeast using chromatographic fractionation, gas phase fractionation, protein gel electrophoresis, and isoelectric focusing. *Proteomics* **5,** 2018–2028.
37. Hall, N., Karras, M., Raine, J. D., et al. (2005) A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* **307,** 82–86.
38. Vitali, B., Wasinger, V., Brigidi, P., and Guilhaus, M. (2005) A proteomic view of *Bifidobacterium infantis* generated by multi-dimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics* **5,** 1859–1867.
39. Durr, E., Yu, J., Krasinska, K. M., et al. (2004) Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface in vivo and in cell culture. *Nat. Biotechnol.* **22,** 985–992.

第22章　膜蛋白的分离、鉴定及其功能分析——GFC/IEC/SDS-PAGE和MALDI-TOF-MS方法

Wojciech Szponarski，Frédéric Delom，Nicolas Sommerer，
Michel Rossignol 和 Rémy Gibrat

摘要　用基质辅助激光解析飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）鉴定膜蛋白之前，需要将这些蛋白质分离出来用以质谱分析。用非变性去垢剂十二烷基-β-D-麦芽糖苷溶液增溶膜样品后，可用离子交换层析（IEC）分离膜蛋白质，并经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），进一步分离蛋白质组分。根据膜蛋白质样品的复杂程度，可在IEC/SDS-PAGE之前，先使用凝胶过滤层析手段分离蛋白质。对最终获得的SDS-PAGE电泳胶板的染色，使我们能简单地建立起一个膜蛋白表达谱以及免疫抗原反应。此外，对疏水性膜镶嵌蛋白的胶内酶解也是很有必要的。通过上述这些分离步骤，最终可实现通过MALDI-TOF-MS对蛋白质的鉴定。本章介绍应用于植物、酵母质膜和植物液泡膜上的膜蛋白分离方法。

关键词　膜蛋白质；液相色谱层析；质谱；拟南芥；酿酒酵母

22.1　前　　言

植物模式基因组测序和功能鉴定的研究成果以及快速增长的许多植物序列的数据[1,2]，使得用基质辅助激光解析飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）获得的肽质量指纹谱来鉴定蛋白质变得轻而易举。这种方法具有高灵敏度、高通量和低成本特点，但需要前期的蛋白质分离。由于膜镶嵌蛋白质在第一相的等电聚焦（IEF）电泳[6]中沉淀，目前最常用的以高分辨率解析从细胞中提取的蛋白质的二维凝胶电泳技术还不适于完全分离膜蛋白质组[3-5]（见第11章），相比之下，十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳可有效分离膜镶嵌蛋白质。

下面要介绍的方法是以离子交换层析（IEC）替代2D-GE电泳中IEF，如果样品量充足，还可以辅以凝胶过滤色谱层析[7]。最终用SDS-PAGE电泳进一步分离膜镶嵌蛋白质。经过上述这些分离过程，许多膜镶嵌蛋白的胶内酶解和MALDI-TOF/MS分析获得了成功。

这个方法的目标之一是在一个单一的实验构架内，分离膜组分中不同类别的蛋白质，包括大部分的疏水、酸性和碱性蛋白。它们可通过染色胶和MALDI-TOF/MS蛋白质指纹谱进行蛋白质分析。本章节介绍的方法可能不能直接应用在其他材料上，但这些方法可以为读者在进行其他材料的实验过程中提供优化指导。

22.2 材 料

(1) 分离缓冲液：5mmol/L BTP-MES（pH 7.5）；0.2mol/L 碘化钾，1mmol/L Na_2EDTA，0.3mol/L 甘露醇，20%（*m/m*）甘油，5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT），0.5%（*V/V*）蛋白酶抑制剂混合物（Sigma 公司）和 15mmol/L *n*-辛基-*β*-D-吡喃葡萄糖苷。

(2) 增溶缓冲液：5mmol/L BTP-MES（pH 7.5），20%（*m/m*）甘油和 0.5%（*V/V*）蛋白酶抑制剂混合物（Sigma 公司）。

(3) 洗脱缓冲液：3mmol/L BTP-MES（pH 7.5），1.5mmol/L 十二烷基-*β*-D-麦芽糖苷（DM）和 20%甘油（*m/m*）。

(4) Laemmli 样品缓冲液：4%（*m/V*）十二烷基磺酸锂，20%（*m/m*）甘油，10%（*V/V*）2-巯基乙醇（2-ME），0.004%（*m/V*）溴酚蓝，0.125 mol/L Tris-HCl，pH 6.8。

(5) 胶段冲洗缓冲液：25mmol/L 碳酸氢铵，乙腈 50%（*V/V*）。

(6) 酶解缓冲液：15mmol/L 碳酸氢铵。

(7) 肽抽提缓冲液：乙腈 60%（*V/V*），0.15%（*V/V*）三氟乙酸（TFA）。

22.3 方 法

22.3.1 膜的分离

因为在研磨材料时，要分离的膜组分以小囊泡形式与可溶的胞质蛋白质混合在一起，所以，最好在分离、鉴定膜蛋白前将这些胞质蛋白质去除掉。为了达到这个目的，我们需要用可穿透这些囊泡的达到临界微胞浓度（CMC）的去垢剂溶液来分离膜组分（见注释 1），使包覆亲水性蛋白质慢慢地向外扩散。增溶缓冲液还含有一种离液盐和一种二价金属螯合剂用来解离松散结合在膜周边的蛋白质。这里所介绍的分离植物质膜的实验过程见图 22-1。

(1) 将 0.5～5mg 的膜组分悬浮在分离缓冲液中（浓度为：0.2mg/ml），4℃搅拌混匀。

(2) 测试时间可长达 4h。

(3) 经过处理后，将膜悬浮液于 4℃，100 000*g* 离心 1h。

(4) 测定上清液和沉淀的蛋白质含量。

(5) 在 SDS-PAGE 上分析膜外周蛋白质组分（上清液）和膜内镶嵌蛋白质组分（沉淀）的条带。

22.3.2 蛋白质增溶

分离膜镶嵌蛋白质首先需要使用去垢剂打破其天然脂环境[8,9]。这里介绍的方法中，我们使用中性或两性离子去垢剂，因为这两种去垢剂不会修饰由 IEC 分离出来的蛋白质的电荷。而且这两种去垢剂作用温和，能保持蛋白质的天然构象与活性。

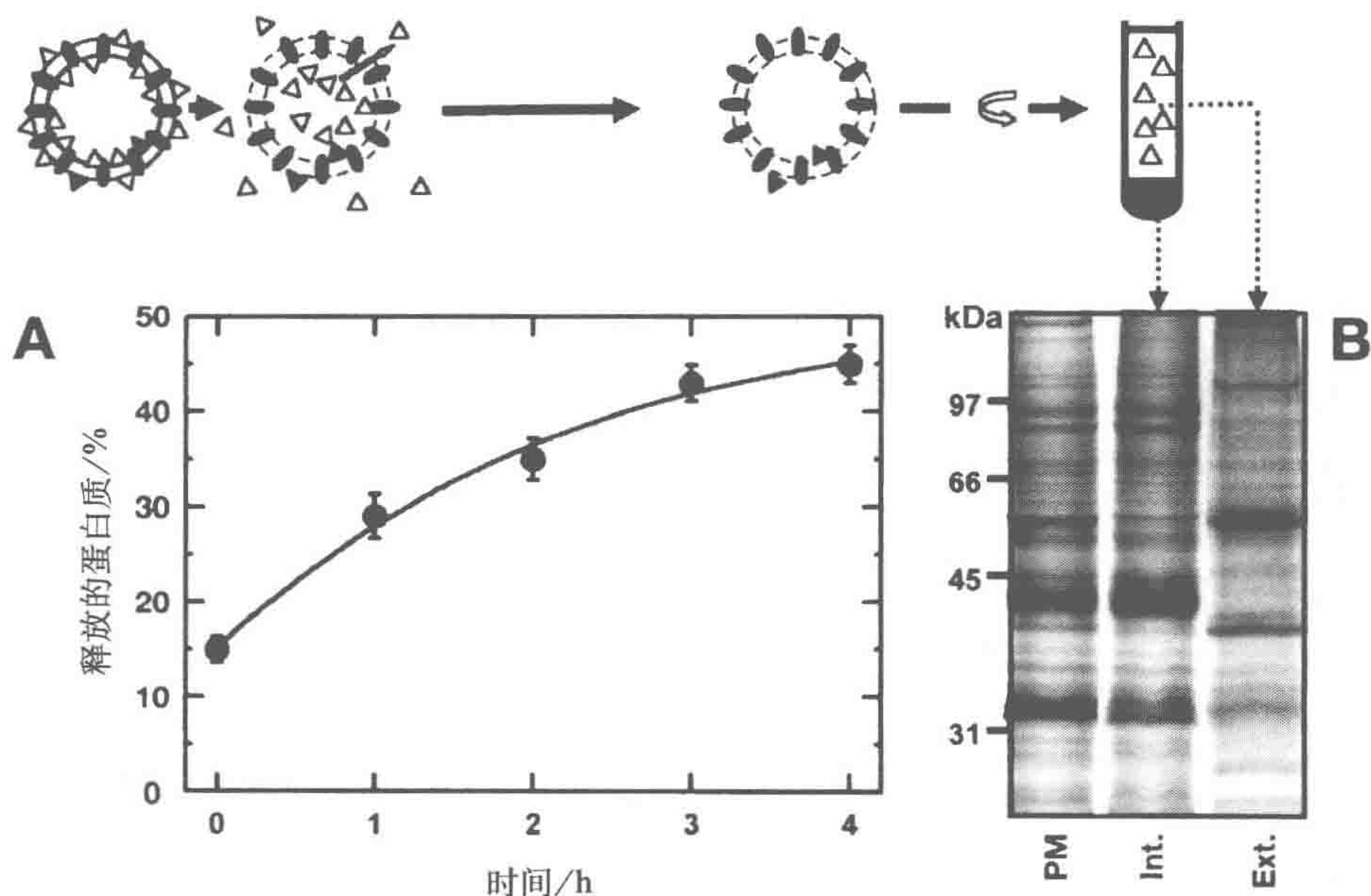


图 22-1 质膜蛋白分离

A. 将拟南芥的质膜（PM）微囊悬浮在含蛋白酶抑制剂的分离缓冲液中，搅拌混匀，使松散结合膜上的极性蛋白质（空心三角形）向外扩散。处理一定时间后，100 000g 离心 1h，定量测定上清液中（膜外周组分）和重悬沉淀中（膜内组分，富含膜镶嵌蛋白质和结合牢固的极性蛋白质，实心图形）的蛋白质。B. 质膜（PM）总蛋白和经 4h 分离处理后的膜内蛋白和膜外周蛋白的 SDS-PAGE 图谱

（1）用 1ml 增溶缓冲液室温下增溶 0.5～5mg 分离出来的膜组分。

（2）添加 1ml DM 溶液于增溶缓冲液中，使 DM/蛋白质比例（m/m）达到 3～7（见注释 2）。

（3）涡旋混匀 2min，室温下低速搅拌，增溶处理 2h。

（4）室温下 190 000g 离心 1h。

（5）定量分析上清液和沉淀中的蛋白质，获得增溶产量。

（6）在 SDS-PAGE 上分析溶解蛋白质（上清液）和不溶解蛋白质（沉淀）的条带。

经过这些步骤可获得与初始 PM 蛋白质很相似的溶解蛋白质的 SDS-PAGE 图谱（图 22-2），约有 85%的初始蛋白质可经上述实验过程溶解出来。

22.3.3 色谱层析

1. IEC/SDS-PAGE 分离

使用 Mono Q HR 5/5 层析柱（Pharmacia/Amersham Biosciences 公司）进行阴离子交换色谱层析（AEC，见注释 3），在整个层析过程中，用 280nm 吸收监测蛋白质洗脱，并设定组分收集容积为 0.3ml。样品和洗脱缓冲液中的去垢剂容易在管道系统中形成泡泡，因此，建议小心超声处理（30min）缓冲液和调整洗脱速度（0.5～1ml/min）。

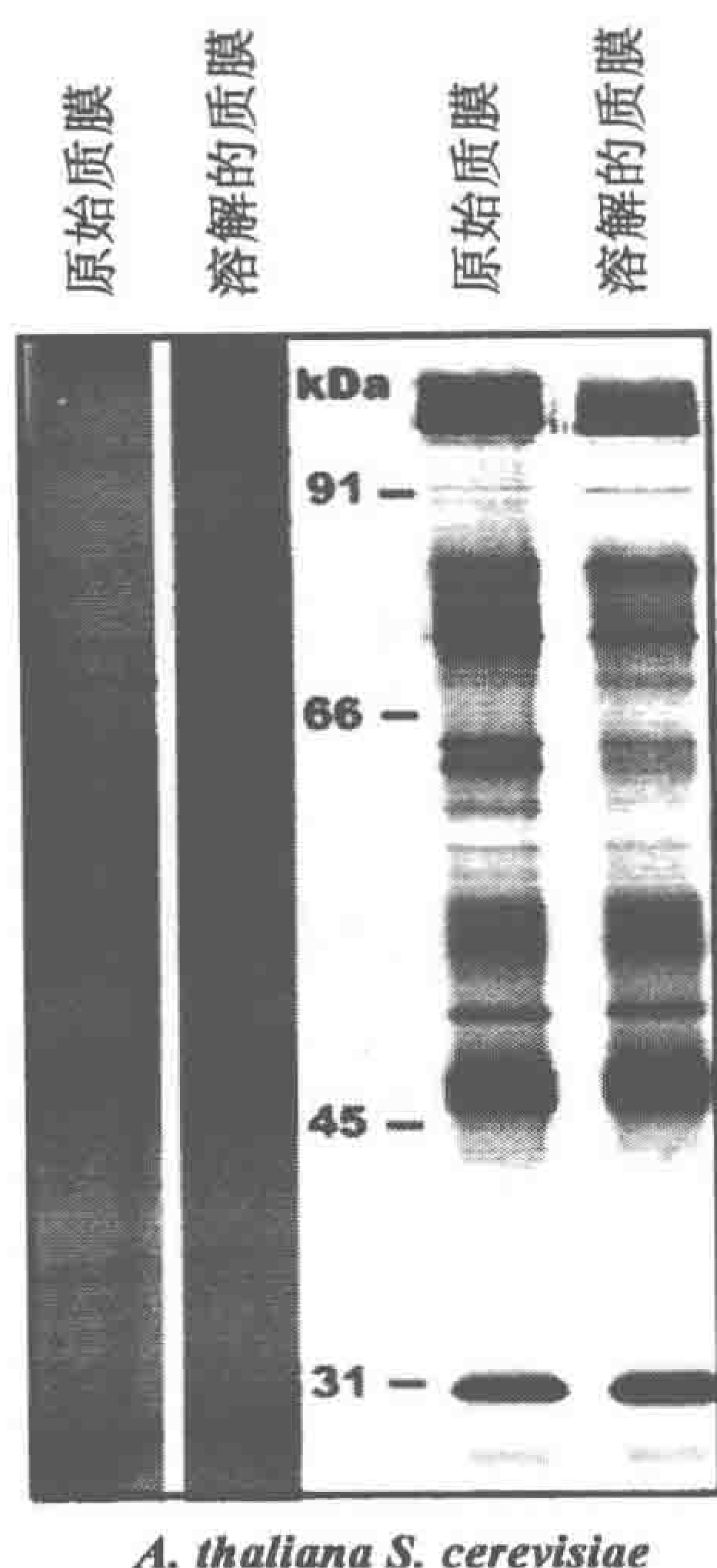


图 22-2　用十二烷基-β-D-麦芽糖苷增溶分离出来的质膜（PM）
具体方法见 22.3.2。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白条带。电泳胶板用考马斯亮蓝染色（拟南芥）或者用银染（酿酒酵母）

（1）室温下，用 15ml 洗脱缓冲液平衡层析柱。

（2）将新增溶出来的蛋白质（0.5～2mg 蛋白质，2ml 溶液）上样到层析柱上，当收集组分时，用 5ml 洗脱缓冲液冲洗柱子。

（3）用 10～15ml 线性盐梯度（在洗脱缓冲液中含 0～1mol/L NaCl 盐浓度）洗脱蛋白质。

（4）用 5ml 含有 1mol/L NaCl 的洗脱缓冲液冲洗柱子，将柱子里的残留样品洗出。

（5）在收集的组分中加入冷丙酮［－20℃，80%（V/V）］，于－20℃下过夜，用以沉淀蛋白质。

（6）用微量离心机 4℃条件下 17 000*g* 离心 30min。

（7）在上述用丙酮沉淀的蛋白质样品中加入 50μl 的 Laemmli 样品缓冲液，涡旋振荡，并超声波振荡处理（超声波水浴中处理 15min），重悬沉淀的蛋白质。

（8）用 SDS-PAGE 分离蛋白质条带。

具代表性的 IEC/SDS-PAGE 分离方法（从 0.5mg 酵母质膜增溶出来的蛋白质开始）见图 22-3A。我们可以看到 3～6 个连续收集的组分中都含有同一条带，用 MALDI-TOF/MS 可以从 70%的电泳条带中鉴定出一个蛋白质，从 5%～25%的条带中鉴定 2 个或 3 个蛋白质（图 22-3B）。比较连续排列的不同处理的同梯度洗脱下来的阴离子交换层析（AEC）组分的 SDS-PAGE 泳道来进行数据分析。

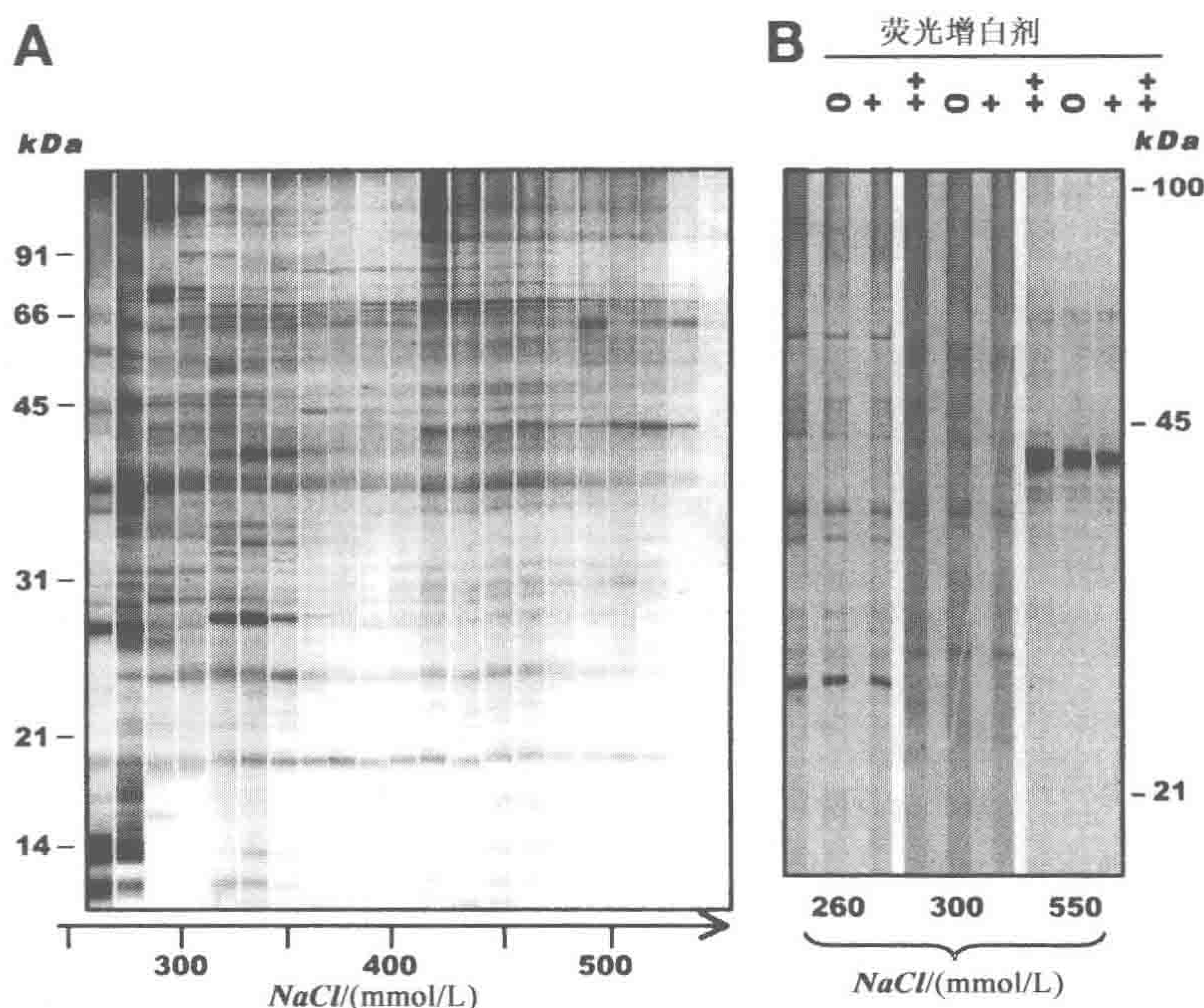


图 22-3　酿酒酵母质膜（PM）蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分离

A. 用 Mono Q HR 5/5 层析柱对 DM 增溶出来的 PM 蛋白质（0.5mg）进行离子交换层析（IEC），按照一定的 NaCl 梯度，以 0.5ml/min 的流速洗脱，然后用 SDS-PAGE 电泳进一步分离。B. 对照酵母细胞（0）或经抗菌荧光增白剂温和处理的活力不变（＋）或活力有所下降（＋＋）的酵母细胞，经 260mmol/L、300mmol/L 和 550mmol/L NaCl 洗脱下来的 IEC 组分的 SDS-PAGE 电泳。相同组分样品点样在一个泳道上，考马斯亮蓝染色。虽然有一些差异，但 3 个泳道的条带非常相似，如 550mmol/L NaCl 洗脱下来的蛋白质组分在 41kDa 分子质量的位置上有一染色明显的条带，这个条带在经抗菌荧光增白剂温和处理的材料中密度降低，IEC 层析之前的 SDS-PAGE 图谱区别不大（数据未列出）

2. GFC/AEC/SDS-PAGE Separation

分离复杂的蛋白质混合物，如膜粗提物，需要两个连续的色谱层析步骤。因此，必须获得较大量（约 5mg）的增溶蛋白质样品。这也有利于低丰度的蛋白质在 SDS-PAGE 电泳泳道上被分辨出来。由于分子筛色谱层析（GFC）会稀释样品，因此它被用在第一步的色谱层析，经 GFC 层析后被稀释的样品经第二步的离子交换层析（IEC）后得到浓缩。下面介绍的是，拟南芥膜增溶蛋白用 Superdex 200 Highload 16/60（Pharmacia/Amersham Biosciences 公司）层析柱进行的 GFC 色谱层析实验（见注释 5）。

（1）用 180ml 洗脱缓冲液，1ml/min 流速，室温下平衡 GFC 层析柱。

（2）将新增溶的蛋白质样品进样到层析柱上。

（3）用 180ml 洗脱缓冲液洗脱蛋白（0.5ml/min），并设置 0.3ml 的收集组分容积。

（4）将邻近组分中蛋白质含量低于 500μg（根据 280nm 吸收估计的量）的组分合并在一起（见注释 6）。

（5）取 100μg GFC 分离组分样品，加入冷丙酮［－20℃，80%（V/V）］，于

－20℃下过夜，用以沉淀蛋白质。

（6）用微量离心机 4℃下 17 000g 离心 30min。

（7）在上述用丙酮沉淀的蛋白质样品中加入 50μl Laemmli 样品缓冲液，涡旋振荡，并超声波振荡处理（超声波水浴中处理 15min），重悬沉淀的蛋白质。

（8）按前述方法用 SDS-PAGE 分离 GFC 洗脱组分的蛋白质。

（9）按前述方法将上述的 GFC 分离出来的组分样品（至少含 500μg 的蛋白质）进行第二步 AEC 色谱层析，使用 Mono Q HR 5/5（Pharmacia/Amersham Biosciences 公司）。

膜粗提物经 GFC/SDS-PAGE 分离后，得到较为复杂的蛋白图谱，特别是在 40～70kDa 区域内（图 22-4）。当经过 GFC/AEC/SDS-PAGE 分离后，可得到较为简单的蛋白质图谱（图 22-5），易于用 MALDI-TOF/MS 鉴定蛋白质（切下的蛋白质条带含较少的蛋白质）。

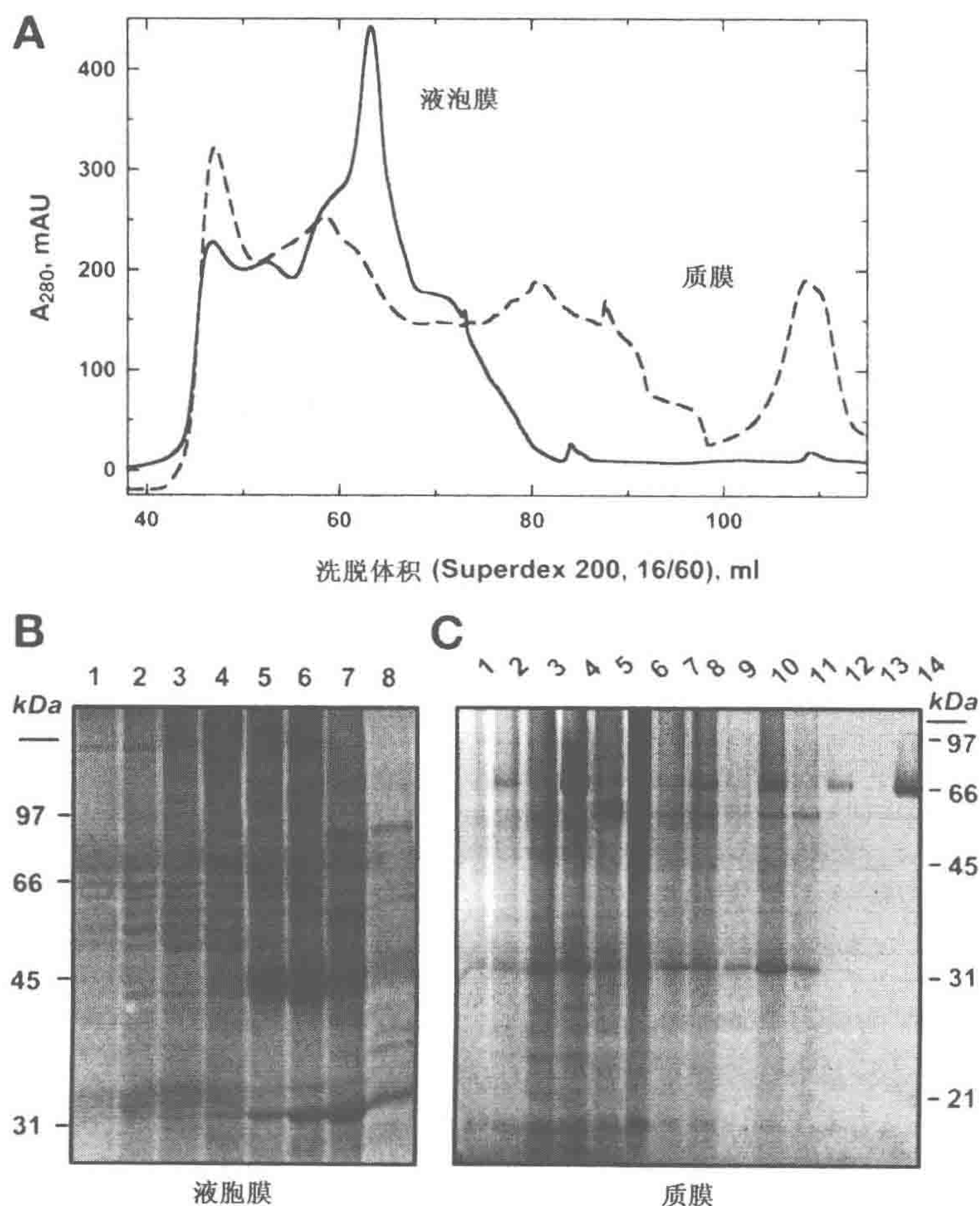


图 22-4　DM-增溶的拟南芥膜蛋白的第一级 GFC 色谱层析

A. 使用 Sephadex200 16/60（Amersham Biosciences 公司）（实线：液泡膜蛋白；虚线：PM 膜蛋白）。连续收集的蛋白质组分用 SDS-PAGE 进一步分离（B. 液泡膜；C. 质膜）。相同的洗脱组分在一个泳道上电泳分离，考马斯亮蓝染色

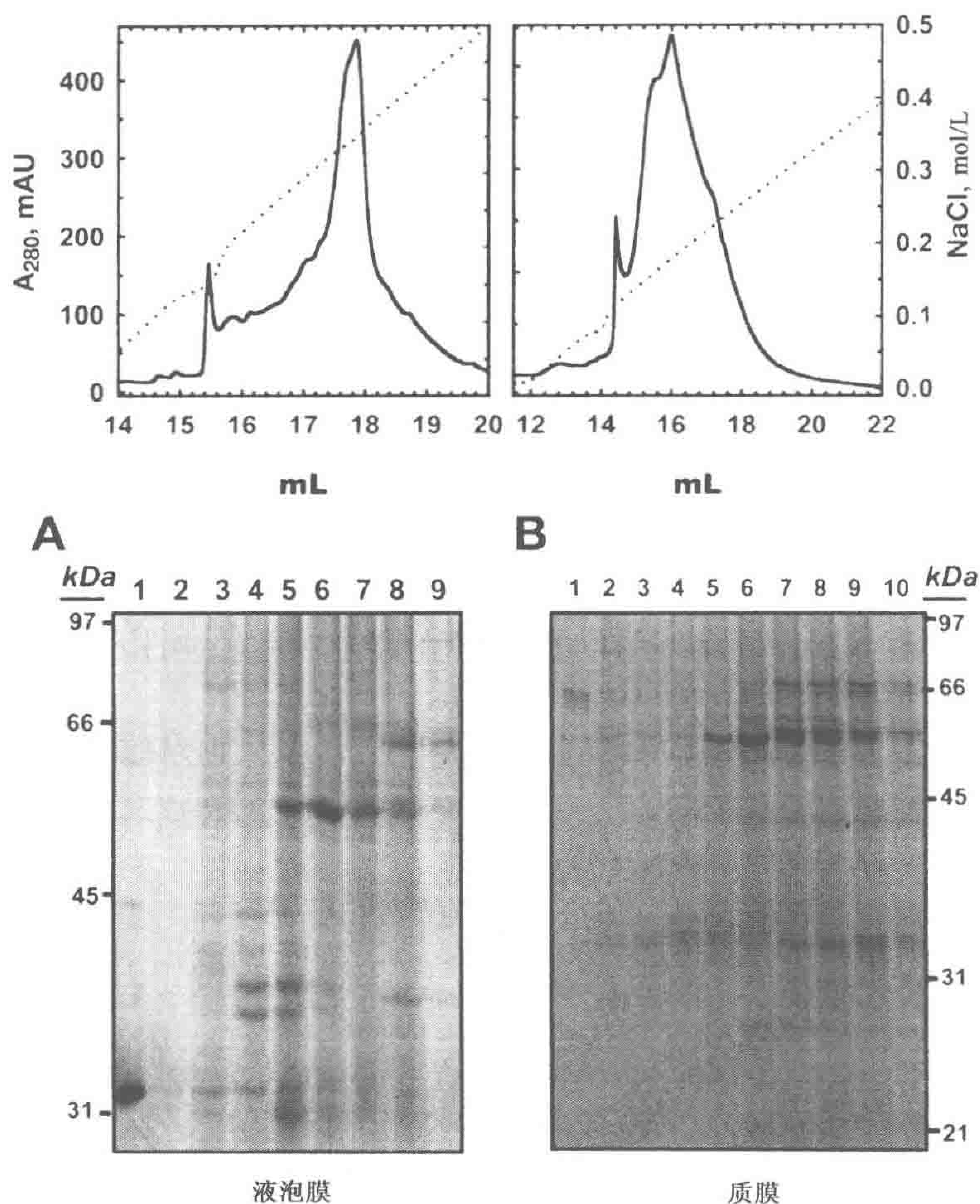


图 22-5 第一级 GFC 色谱层析后收集的拟南芥膜蛋白组分在 IEC 上进行的第二级色谱层析
使用 Mono Q HR 5/5 层析柱（Amersham Biosciences 公司）、线性 NaCl 梯度洗脱，并用 SDS-PAGE 进一步分离。相应蛋白组分的 IEC 色谱层析（上图）和 SDS-PAGE 图谱（下图）显示在图 22-4 中的：A. GFC 的 B2 组分（液泡膜蛋白）；B. GFC 的 C5 组分（质膜蛋白质）。每个泳道上加样相同体积的洗脱组分溶液，考马斯亮蓝染色

22.3.4 胰蛋白酶胶内蛋白消化

（1）切下考马斯亮蓝染色的条带。

（2）用 2ml（在 2ml 离心管中）洗胶液充分冲洗切下来的胶粒至完全褪色，一般来说，两次 4h 的脱色冲洗可完全脱去胶粒的颜色。

（3）将褪色的胶粒在纯乙腈溶液中脱水处理 1h。

（4）用真空干燥器完全干燥胶粒（30min）。

（5）4℃条件下，用消化缓冲液制备新鲜的胰蛋白酶溶液（0.02μg/μl），防止酶的自身消化，置冰上备用。

（6）将干燥的胶粒置于小离心管中，滴入 15μl 的胰蛋白酶溶液，将管子插入冰中，

水化胶粒。30min 后，胶粒上只有薄薄的一层胰蛋白酶溶液。当初始加入的胰蛋白酶液滴被胶粒完全吸收后，加入 15mmol/L 碳酸氢铵缓冲液，使胶粒周围包裹一层薄薄的碳酸氢铵。如果初始加入的胰蛋白酶溶液未被胶粒完全吸收，吸出多余的胰蛋白酶溶液，使胶粒周围只有一层薄薄的胰蛋白酶（见注释 7）。

（7）将装有胶粒的离心管封口，37℃至少保温 5h，也可保温过夜。

（8）加入 150μl 肽段萃取缓冲液，20℃保温 3h。

（9）去掉胶粒，用真空干燥器将 500μl 离心管中的肽段萃取液浓缩至 5μl。千万不要将肽段萃取液完全干燥，因为那样会使肽段吸附在管壁上而洗不下来。

22.3.5 MALDI-TOF/MS

在本书介绍的通用步骤（见第 19 章）之后，蛋白质将在靶上结晶，这里简单阐述如下：

（1）用半饱和的 1∶1 乙腈/水溶液新鲜配制 α-氰基-4-羟基肉桂酸，并用 0.1%TFA 酸化。

（2）将 0.8μl 的蛋白质样品与 0.8μl 的基质混合，并立即点样到靶上。

（3）让样品在靶上干燥和结晶。

（4）用超纯水冲洗靶后，让其干燥。

当谱图稳定后，读取谱图（200～300 次激光轰击，见注释 8）。

22.3.6 数据库检索

现在有许多不同的搜索引擎可以用来鉴定已获得肽质量的蛋白质，ProFound[10] 能够很好地用来进行蛋白质混合样品（最多可达 4 种蛋白质）的鉴定。在我们的分析中，总是假设为混合样品（虽然也会出现最终的鉴定结果表示只有一种蛋白质）。检索所用的参数如下：合适的物种分类范畴（拟南芥或酿酒酵母）；质量误差为 0.1Da（允许肽段质量偏离校准范围的最大值）；允许 1 个酶切缺失位点；蛋白质分子质量范围：0～1000kDa；*pI* 范围：0～14；氨基酸未被化学修饰。考虑到混合物中可能存在的蛋白质种类的数量，可以进行最多 4 次改变可能的蛋白质的数量设置（最大设置为 4）。存取检索运行中获得的最高分值的结果。对于每个鉴定的蛋白质，实验匹配质量用在最终的 ProFound“单个蛋白质”检索。最后，那些可能性接近 1，且 *Z* 分值高于 1.65 的蛋白质才予以考虑。

22.4 注　　释

（1）在分离膜蛋白时，还没有理想的方法彻底去除包覆亲水性蛋白和膜外周蛋白，使用亚临界胶团浓度的去垢剂打开膜蛋白微囊可能会不恰当地去除膜镶嵌蛋白质。判断膜分离过程的好坏，需要鉴定被去除掉的蛋白质。另外，如果无法去除膜外周蛋白质，那就跳过膜分离步骤，直接应用图 22-4 和图 22-5 中表示的连续两步色谱层析（先是 GFC，然后是 AEC）[7]。

（2）膜蛋白增溶是一步值得花时间仔细优化的实验步骤，首先，DM 已经被越来越

广泛，而且也越来越成功地应用于增溶不同生物材料中具有功能活性的膜蛋白[8,9]，因此，它常常被推荐用做第一个测试实验。第二，DM/蛋白质的比例以及低速搅拌的增溶时间都需要进行优化实验。有时候在充满氩气和密封管子里的蛋白质混合物经过剧烈的涡旋振荡后可得到更高的增溶产率。

（3）应当通过预实验测试不同离子交换树脂对实验材料增溶蛋白质的分离效率，特别要比较层析柱结合蛋白质的容量和盐梯度洗脱结合在柱子上的蛋白质的能力。这里所用的膜材料，可被阳离子交换剂不可逆结合，所以最好使用阳离子交换剂（能洗脱出来 95%的柱结合蛋白）。

（4）在 pH7.0 条件下加样，约有 80%的增溶蛋白质结合在 Mono Q HR 5/5 层析柱上（Amersham Biosciences 公司），增加样品加样缓冲液的 pH（最大可达 11），能提高蛋白质的柱结合率（最大可达 100%）。

（5）使用温和去垢剂增溶膜蛋白时，个别蛋白质可能会形成小的胶团，而超分子蛋白复合物可能会形成较大的胶团。若要估算胶团的大小，就需要取小样进行 GFC 色谱层析预实验，使用低样品进样量和宽分离范围的层析柱，如 Superose 6 10/30（Pharmacia/Amersham Biosciences 公司），这样可以让我们在以后的实验中选择更加合适的层析柱（具有较窄的分离范围、较强的分离能力以及较大的样品进样量）。

（6）GFC 组分必须含有足够量的蛋白质（一般要 0.5g 蛋白质），以保证第二级的 AEC 色谱层析和最后的 SDS-PAGE 电泳分离。

（7）防止胰蛋白酶的自身消化，对于有效消化蛋白质、在 MALDI-TOF 质谱上主要含胰蛋白酶消化肽以及减少其他肽段的信号来说，是非常重要的。为此我们必须做到以下几点：①避免使用过量的胰蛋白酶，以上实验方法中介绍的胰蛋白酶使用量可以考虑为 7×2mm、中等强度考马斯亮蓝染色的胶粒所需的最大量；②尽量减少胰蛋白酶溶液的使用量，保证在 37℃温浴之前的胶粒完全吸收胰蛋白酶溶液后，仅有一薄层胰蛋白酶溶液包裹着胶粒。注意之前提到的，在浓缩过程中，千万不要让含肽的溶液完全干燥。

（8）经过几十次激光轰击后，图谱质量常常变化很大，这似乎是膜蛋白肽段的特征，这意味着在介质表面的激光剥蚀和“易飞行”肽段的激光解析后，其他肽段能被进一步解析和离子化。因此，加和更多的质谱图谱（可多达 300 次激光轰击）将会带来更好的效果。

致谢

植物和酵母膜蛋白的分离与鉴定分别得到 Génoplante（New Tools 19993663 和 2001027）和 Aventis Pharma（FR00ANT043）的支助。

参 考 文 献

1. Godovac-Zimmermann, J. and Brown, L. R. (2001) Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* **20,** 1–57.
2. Rappsilber, J., Moniatte, M., Nielsen, M. L., Podtelejnikov, A.V., and Mann, M. (2003) Experiences and perspectives of MALDI MS and MS/MS in proteomic research. *Int. J. Mass Spectr.* **226,** 223–237.

3. Santoni, V., Malloy, M., and Rabilloud, T. (2000) Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21,** 1054–1070.
4. Gygi, S., Corthals, G. L., Zhang, Y., Rochon, Y., and Aebersold, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97,** 9390–9395.
5. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., et al. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21,** 1037–1053.
6. Klein, C. Garcia-Rizo, C. Bisle, B., et al. (2005) The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *Proteomics* **5,** 180–197.
7. Szponarski, W., Sommerer, N., Boyer, J. C., Rossignol M., and Gibrat, R. (2004) Large-scale characterization of integral proteins from *Arabidopsis* vacuolar membrane by two-dimensional liquid chromatography. *Proteomics* **4,** 397–406.
8. le Maire, M., Champeil, P., and Möller, J. V. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508,** 86–111.
9. Seddon, A. M., Curnow, P., and Booth, P. J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* **1666,** 105–117.
10. Zhang, W. and Chait, B. T. (2000) ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Anal. Chem.* **72,** 2482–2489; http://prowl.rockefeller.edu/profound_bin/WebProFound.exe.

第23章　2-DE蛋白质组学的PROTICdb数据库

Olivier Langella，Michel Zivy 和 Johann Joets

摘要　PROTICdb是一种主要为存储和分析通过2D聚丙烯酰胺电泳和质谱分析得到的植物蛋白质组数据的网络数据库。开发PROTICdb的目的是：①存储、跟踪、查询与蛋白质组学实验相关的信息，从组织取样到蛋白鉴定和定量分析；②将使用者的专业知识和其他来源的信息整合成一个用于支持数据分析的知识库（如用于等位基因变异或翻译后修饰产物的鉴定）。数据通过Mélanie，PDQuest，IM2d，ImageMaster(tm) 2D Platinum v5.0，Progenesis，Sequest，MS-Fit，Mascot等软件处理之后可上传到PROTICdb关系型数据库中，也可以在网络上直接填写（实验设计和方法）。2D聚丙烯酰胺电泳注释图可以通过GelBrowser显示、查询和比对。定量数据可被方便地以列表形式导出，供任何第三方软件进行统计分析。PROTICdb是基于Oracle或PostgreSQLDataBase管理系统，可从以下网址免费获取：http：//cms.moulon.inra.fr/content/view/14/44/。

关键词　数据库；比较蛋白质组学；质谱分析；聚丙烯酰胺双向电泳；基因本体

23.1　前　　言

聚丙烯酰胺双向电泳[1]和质谱分析是分离一个组织中的蛋白质（2D电泳图谱）[2]以及鉴定差异蛋白表达[3,4]的有用工具。

一个典型的蛋白质组实验会得到几张双向电泳胶板和相应的几百甚至几千个蛋白质点的图形、定位和定量数据及其质谱信息。最后数据必须综合、比对转化成生物学假设，这项工作并不轻松，因为它包括了许多不相干的技术和方法以及大量的数据。

开发PROTICdb数据库是为了处理植物蛋白质组学中从2D聚丙烯酰胺电泳和质谱分析得到的所有数据[5]。该数据库可以自动建立与外部序列数据库的链接，并用基因本体（GO）术语注释蛋白质，为用户提供一个链接公共功能信息的接口。那些对学者或数据分析有价值的，来自生物学家的，与蛋白质点相关的发现和结论可被存储在PROTICdb的知识库中。我们已经可以在两个蛋白质点之间建立二元关系，如匹配度、等位性和翻译后修饰。通过分析这些关系，PROTICdb数据库能推断出新的关联，建立蛋白质点的网络，将鉴定数据从一个点扩展到相同蛋白质点网络中的其他成员，所以，当一个新的关联加入到数据库后，或许能完成之前实验得到的蛋白质点的注释。

http：//cms.moulon.inra.fr/content/view/14/44/网站免费提供PROTICdb（仅

限于工具)，而且还在继续更新。本章介绍的是 1.0.7. 版本，未来的版本将包括一个先进的查询工具，使用者可用此查询工具进行反复查询，操作每一个新的步骤，用户都可以根据需要进行更加精确的查询。

23.2 材　　料

PROTICdb 用户端/服务器的应用包括数据库管理系统（DBMS)，网络伺服器（服务器端的应用）和一个通常是网络浏览器（也称为用户端）的用户界面。

23.2.1 软 件 要 求

1. *服务器端*

一台安装了 Apache(1.3.33 或更高版本，http://www.apache.org/)、PHP(4.3.4 或更高版本，http://www.php.net)和 Perl(5.8.4 或更高版本，http://www.perl.org)的 Unix/Linux 服务器。PROTICdb 数据库可设在本地服务器或一台远程服务器上。可用 Oracle8i 或 Postgresql (7.4.7 或更高版本，http://www.postgresql.org/)DBMS 运行 PROTICdb。

2. *用户端*

终端用户可以使用任何兼容 CSS 以及开启 JavaScript 的新近开发的网络浏览器(Internet Explorer 5 或更高版本，Mozilla/Firefox 版本 1.0 版或更高版本，http://www.mozilla.org) 或 Konqueror (3.3.2 或更高版本，http://www.konqueror.org/)。XHTML 1.0 的网络标准(http://www.w3.org/)支持 PROTICdb。

浏览凝胶需要在用户端计算机上安装 Java1.4 版本或更高版本(http://java.sun.com/)。

23.2.2 服务器安装

下载最新的存档（http://cms.moulon.inra.fr/content/view/14/44/)。解压缩，并仔细阅读安装向导（Protic/doc/install/pdf/install.pdf)。安装结尾时，应运行 PROTICdb“诊断页”(protic/home/diagnose.php)。这个工具将帮助用户修复与 Perl, PHP 和 Apache 相关的配置错误。在 proticdb-support@moulon.inra.fr 网页可以找到 PROTICdb 技术支持，包括安装问题或错误报告。

23.3 方　　法

23.3.1 PROTICdb 概述

在输入或浏览数据时，每个最终用户需要一个 PROTICdb 账户（由您的管理员创建)。作为一个新用户，首先要创建一个新的项目。一旦建立，该项目就属于这个用户，这个用户有权授予其他用户访问权限。为确保数据一致性的精确度，尽量不要用手动输入操作。因此，网页上包含受控词汇或以前加载到数据库的其他数据的组合框。当建立

一个新的 PROTICdb 数据库时，受控词汇库是空的，用户可根据需要填充。这将确保一个公认的，如果可能的话，尽可能标准化的词汇表。这对于查询非常重要，因为这可以减少同义词的使用以及错误拼写。

网络界面包括以下 3 个主要内容：主菜单，弹出菜单和工作空间（图 23-1)。"用户登录"和当前项目的名称（之前选中的项目）显示在 PROTICdb 徽标下方。

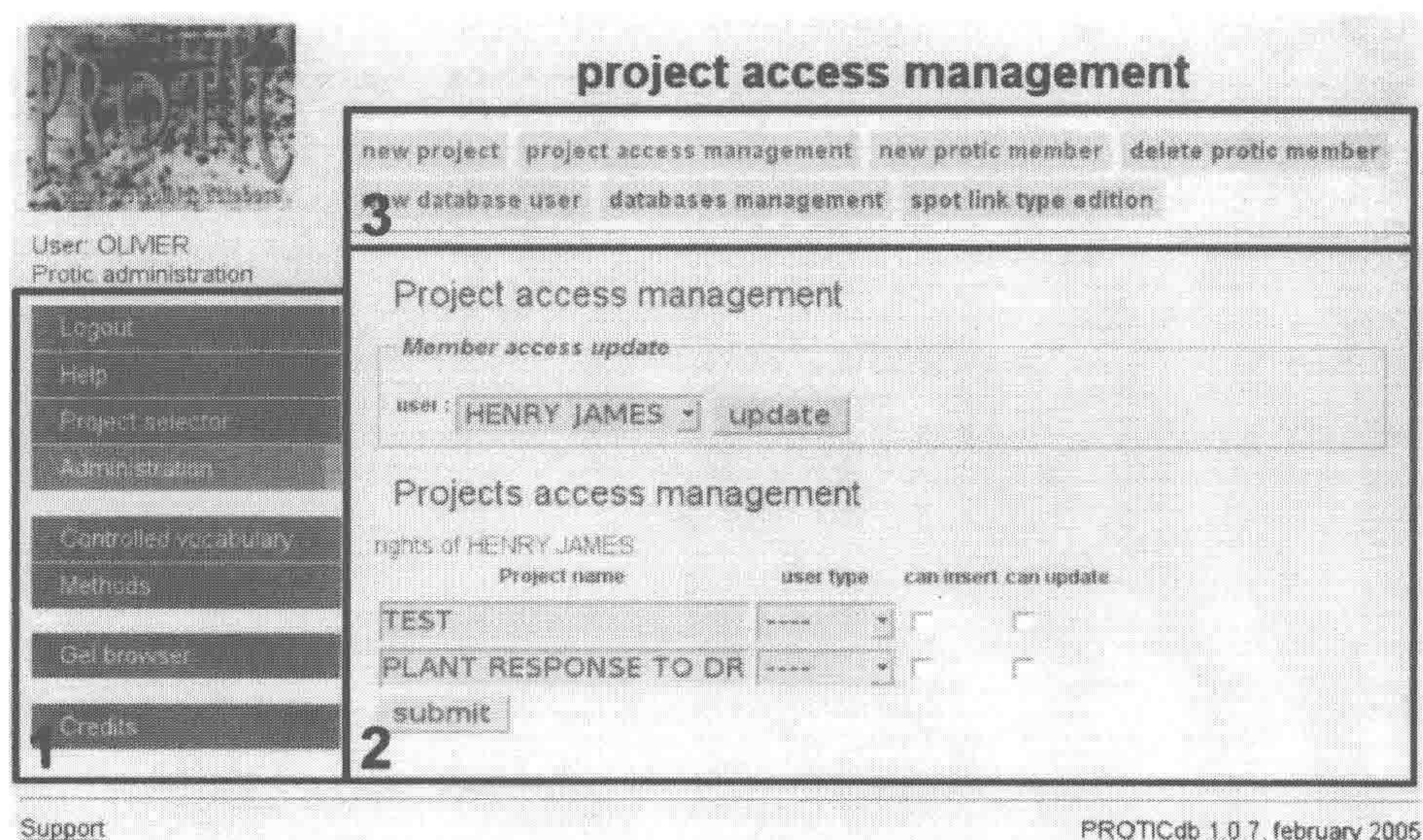


图 23-1　PTORICdb 界面的组织结构

1：主菜单；2：工作空间；3：弹出菜单

数据必须加载到一个 PROTICdb 项目中。不过，有可能要建立一个或多个项目，来满足你整理数据的需要。

这里介绍的练习将基于一个从 http：//cms. moulon. inra. fr/content/view/14/44/获得的示范数据集。

23.3.2　网络形式的数据库建设：梅拉尼 2D 凝胶图像分析结果的上传

为了学习这部分教程，用户首先要创建一个项目，然后装入所有与植物 2D 凝胶相关的信息，特别是那些凝胶图像采集和分析的信息，包括植物培养条件、蛋白质提取过程、电泳和凝胶图像分析方法。

1. 创建一个新的项目

（1）访问 PROTICdb 主页，并登录（向你的 PROTICdb 管理员索取个人账户)。

（2）在主菜单页选择"administration"条款，然后点击上方的弹出菜单中的"new project"。"new project"表格如图 23-2 所示。

（3）为新项目填入一个名称，如果需要的话，添加一个定义或评论。

图 23-2　“new project”界面格式

（4）在列表中选择一个关键词，或者点击“new/update”建立或是修改一个关键词（见注释 1）。数据库一开始不包含任何关键词。因此新用户必须输入关键词。为选择标准术语，或试图在实验室水平建立这样的标准提供方便。每一个关键词都可以输入一个定义。建议给出两个“级别”的关键词。这可能有助于该项目的归类和检索。例如，第一级关键词可能是一个通用术语，如胁迫，第二级关键词可以更加特指，如冷或干旱。

（5）点击“go.”。

如果发生错误，按照操作指南检查并且重新输入新的项目。

2. 项目选择器

要先从“project selector”中选择数据，以便把它们安装到新的项目中。这也适用于将来连接到 PROTICdb。

（1）从主菜单选择“project selector”。

（2）在组合框中选择您的项目。

（3）提交。

选定的项目即为当前数据库的项目。其名称将在 PROTICdb 徽标下随登录的用户名一同显示。当前项目的概况（植物的数目、蛋白质提取物、凝胶、检测、鉴定）都展示在工作表中。

这时主菜单显示出两个新条目："form basd feeding" 和 "file based feeding"。这是将数据提交给数据库的两种途径。

3. 通过网络形式提交 2D 凝胶图像文件的植物定义

要想将植物数据输入到图像文件中，一种办法是填写几个网页表格。正如前面提到的，如果需要的话，这些表格允许用户从列表中选择词汇。如果列表中没有合适的词汇，可以选择 "new" 键创建一个新的词汇（见注释 2）。本节中，我们综述植物个体、植物样品、蛋白质样品、凝胶、凝胶成像模式。然后我们将上传梅拉尼结果文件。

（1）在主菜单上选择 "form based feeding" 项。"new plant" 表格（图 23-3）显示在工作空间中（见注释 3）。在一个项目中，一个植物必须和 "PROTICdb 实验" 关联（见注释 4）。

图 23-3　"new plant" 表格

（2）填入一个植物名称（见注释 4）。在本演示中，不需要指定一个具体的植物名称或其他领域。演示可以在任何名字，受控词汇条款，或方法名称下进行。但是，凝胶成像的名称必须对应一个真正的 2D 凝胶（见下文）。

（3）按照要求，选择或创建（新按钮）遗传数据。遇到无关栏目，可以空着不填。基因型是一个受控词汇。如果合适的基因型未列出，可以点击 "new" 按钮，按照以下步骤新建：一旦进入新的基因型表格界面，填入物种学名（见注释 1）和基因型名称（如 *Zea mays* 和 F2）。点击提交，这个新的基因型将被记录，同时 "new plant" 基因型列表被更新。继续填写 "new plant" 表格。继续从各个区域已有的列表中选择各项合适的名称，包括有关 "cultivation" 的数据（见注释 5）。

（4）新建或选择一个实验（见注释 4）。

（5）你可以声明你的数据是私有的还是公共的，未来的高版本的 PROTICdb 将具

备这个功能，但你现在必须考虑这个问题。

(6) 可以加注文字注释。这可能对输入那些在后续的数据分析中起重要作用的非系统推荐数据有用。

(7) 递交“new plant”(见注释 6) 数据。如果出现错误，按照操作指南检查并且重新输入。

(8) 输入植物样品采集的数据：点击弹出菜单工具栏中的“plant sample”链接。如前所述填写表格。当提交了“new plant”表格，数据库得到更新后，就可以在植物栏中选择到相应的植物。

(9) 填写完成“gel”表格。这最后的表格和前面的那些表格一样，共迁移电泳的实验特征已包含在 PROTICdb 中。进样数目必须填在“sample number”栏目中。这个表格随着所需“protein sample”栏目的增加而更新 (见注释 7)。

(10) 填写完成“gel image”的表格，为凝胶成像输入名称 DV02121001，使其与演示数据集一致。凝胶成像文件必须是 jpeg 格式，值得注意的是，所提供的凝胶成像的分辨率必须与用作蛋白质点鉴定时一致 (见注释 8)。为了演示目的，图像文件 DV02121001. jpg 可从 PROTICdb Demo. zip 中找到。这个图像对于后续的演示也是需要的，所以请确认您已成功地下载了这个图片。

4. 梅拉尼生成的输出文件的上传

(1) 由梅拉尼软件生成一个检测报告，并把它输出到一制表分隔的文本格式文件 (见注释 9)。文件扩展名为“. txt. ”。本演示中，使用 PROTICdb Demo. zip 中的 detections/DV02121001. txt. 文件。

(2) 从主菜单中选择“form based feeding”→在工具栏中选择“spot detection (new/update)”。就会出现一个带有软件列表的组合框。

(3) 选择“MELANIE”软件，并提交。这时出现“spots detection file upload form”表单 (图 23-4)。

图 23-4　蛋白点检测文件上传表格

（4）按照以下顺序填写表格：

a. 数字查询系统：你可以选择一个参考名称，通常指主凝胶的名字。

b. 检测软件：选择用于执行检测的软件的名称，这里选择“MELANIE”。

c. 检测方法：这里指的是用于检测蛋白点的方法，如果需要的话，你可以新建或更新一个方法（见注释 5）。

d. 凝胶成像：选择做完蛋白点检测的凝胶名称，这里选“DV02121001”。

e. 扫描方法：指的是用来归一化蛋白点丰度数据的方法。

f. 主胶：指明所用凝胶是否为主凝胶（或参照凝胶）。在本演示中，凝胶 DV02121001 被视为主凝胶。

g. 权力保护：目前没有激活。但是，这一项应被列入未来公开发表数据的政策中。

h. 文件：点击这个按钮可浏览本地计算机磁盘（或网络分配磁盘），选择正确的梅拉尼生成的输出文件。在本演示中，选择“PROTICdb Demo. zip.”中获得的“detections/DV02121001. txt”文件。

i. 匹配文件：仅用于非主凝胶的梅拉尼文件上传。梅拉尼匹配文件包含一张凝胶和主凝胶之间匹配实验的结果。因为它与本演示无关，留空不填。

所有必填栏目填完后，提交表单。数据库处理这个文件可能要花很长的时间，这时千万不要中断 PROTICdb。如果发生错误，根据提示更正，并重新提交（见注释 10）。

当处理完毕，系统通过 e-mail 将成功/错误的通知发送给用户。如果发生了错误，不记录任何蛋白点的鉴定数据。要按照提示更正，并重新提交。

注明蛋白点的位置和丰度数据的凝胶成像现在可以在凝胶浏览器上显示了（见 23.3.5，凝胶浏览器）。

23.3.3　基于文件的数据库填充：从个别植物到质谱

在这个数据提交实例中，我们将看到如何提交蛋白点检测和质谱鉴定结果。首先，我们必须创建或选择一个项目（见 23.3.2），之后填充关于植物、植物样品、蛋白提取、凝胶以及成像的所有信息。这些数据将用来演示数据填充的第二种方法，即基于文件的填充方法。

1. 上传“plant2image”文件

（1）打开 PROTICdb 主页，并登录网页。

（2）从主菜单→“project selector”中选择一个项目，或者创建一个新项目。

（3）选择主菜单→“file based feeding”→“plant2image（txt 文件）”（弹出菜单）。这时显示“plant to image file upload”和“gel image file upload”表单。

（4）在“plant to image file upload”表单中选择或创建一个实验（见注释 4）。

（5）从“plant to image file upload”表单中检索“plant2image”文件，用浏览器按钮上传。在本演示中，可在 PROTICdb Demo. zip 找到上传的 plant2image. txt 文件。通过点击“here is the excel template file”这个链接，就可以访问一个 plant2image 模板文件（见注释 11）。这个文件的每一行分成 5 个部分描述一个样品：图像，凝胶，蛋

白质样品制备和凝胶上样，植物样品的采集，以及植物的描述。当填写完这些部分，选择“tabulation-separated text”保存该文件。

(6) 在“Plant2image file upload”表单中点击“submit”按钮（千万不要点击第二张表单中的提交按钮）。然后用 proticdb 处理这个文件。这可能会很耗时。处理过程中不要中断处理进程。众多的测试是要确保数据的一致性使其与受控词汇相配。提交文件中的方法名称必须符合已经在数据库中描述过的方法名称（新方法必须在事前被记录；见注释 5）。如果测试失败，系统将通过 e-mail 将错误报告的邮件发送给当前用户，不保存所有数据。这时应按照错误报告建议更正并重新提交全部文件。如果处理成功，一份成功报告也会通过 e-mail 发出。

(7) 从“gel image file upload”到“image file format,”选择“jpg.”浏览您的电脑磁盘，选择与 plant2image 文件中描述的数据相对应的凝胶成像文件（见注释 8）。JPG 格式凝胶图像必须用这个表单一张一张地上传。在本演示中，上传的 DV02041611. jpg 和 TB02052306. jpg 文件保存在“demo. zip”压缩文件中。

(8) 提交“gel image file upload”表单。

2. 质谱鉴定命令

单个蛋白质点可能被命名为几个名称或代码，如检测点数、匹配数、采集数等。因此，用一个质谱图去关联一个适当的蛋白点没有多大意义。为了避免错误，PROTICdb 的工作流程之一是生成一个携带单一的，送去做质谱鉴定的蛋白点质谱仪 ID 的文件(相当于一个命令)。质谱仪就可以将携带蛋白点 ID 的结果返回到数据库中，这样就避免了名称含混不清的问题。在这个实例中，描述装有切下的蛋白点的微孔板的文件将被提交给数据库。在微孔板图中，每个切下来的蛋白质点都事先被用户命名为“picked _ spot”。这个工作流程假设这个命令在图像分析数据（蛋白质点检测）被记录到数据库之前被发送到质谱仪。这样，当用户随后提交蛋白点检测和比对数据时，他或她将同时提供与蛋白点检测和比对数据代码相关的适当的“picked _ spot”命名。这一步至关重要，因为它使得数据库将“picked _ spot”的编号与比对代码关联起来，确保能准确无误地整合质谱数据。

“Identification Order”创建步骤的输出是一个基本的“Sequest”软件兼容的文件。它包括微孔板上的每个样品。这个文件很有用，因为它可用“sequest”软件直接读取(见注释 12)。

按以下步骤建立一个新的命令：

(1) 在主菜单选择“file based feeding”→ 然后在弹出菜单中选择“MS identification request (in)”。

(2) 选择“order spot identifications from one picture/detection”并提交。

(3) 选择与样品相应的凝胶成像图。(在这个实例中，微孔板上的蛋白点来自同一块凝胶）然后选择“DV02041611”图像。

（4）点击“request MS identification order for this picture”按钮，一个新表单便出现（图 23-5，第 1 步）。

图 23-5　质谱鉴定申请表单（第一步）

（5）点击按钮“create a new virtual detection for this picture”创建一个虚拟蛋白点检测结果（记住：前面的图像分析结果直到现在还没有提交），这样就将微孔板中的蛋白点建立在数据库中。当真实的蛋白点检测实验完成后，上传结果，并且将质谱结果填入数据库后，这些蛋白点的信息将被更新。

（6）选择在第 13 步建立的“virtual detections”加载质谱鉴定结果。当梅拉尼输出文件提交后，那些“virtual detections”将被“real detections”所取代。这时名为“now you can submit your order”的新表单出现了。（图 23-6，步骤 2）

（7）输入本次实验所用的微孔板的号码，点击“set microplate number”，接着点击“get the microplate template”，下载 excel 模板文件。在微孔板 excel 模板文件中，输入在这个鉴定命令中所用的微孔板的号码，当前 PROTICdb 用户的邮件地址，以及微孔板中的孔号（12 列 8 行从 A 到 H），所用样品的准确名称：在 23.3.3 节 2 中用到的“picked_spot”号码（见注释 1）。保存你的 Excel 文件为“tabulation-separated text”格式（见注释 11）。这张图对应着你的质谱仪中微孔板。准备足够多的微孔板文件。在这个演示中只有一个微孔板文件：“demo. zip”文件夹中的 microplates/microplatedemo. txt。

（8）输入上样到微孔板上的样品号码，在这个演示的微孔板上有 9 个样品。

（9）浏览你的电脑硬盘选择微孔板文件。在这个演示中从准备好的“demo. zip”文件夹中获得“microplatedemo. txt”文件。注意在微孔板文件中的 e-mail 地址必须与 PROTICdb 中当前用户的 e-mail 地址一致。在“related species”中输入：根据 NCBI 分类系统的种、属名称（与样品相关的来自其他物种的序列有时用于蛋白质鉴定的检索）。在本演示中输入“Oryza sativa.”。

（10）填写余下的表单内容，然后点击“Submit”。如果发生错误，会出现错误提

图 23-6　质谱鉴定申请表单（第二步）

示信息。根据信息提示更改你的文件，重新提交。提交成功会出现“order n created！”信息。记住这个识别命令代码，为方便日后访问鉴定报告。会有一封针对这个命令的输入文件以电子邮件的形式发送到当前用户。保留这个信息，保存这个输入文件。这个文件应当和蛋白点的微孔板一起被送到质谱仪。

3. 蛋白点检测结果文件的上传

使用 Mélanie 软件时，你要用相应的“picked _ spot”名称注释每个蛋白点（见 23.3.3 节 2）。而要这样做的话，必须建立一个用户定义的“picked _ spot”专栏（见 Mélanie 程序说明）。然后导出一份指标文本格式的蛋白点报告。

保存 Mélanie 检测文件后，按照如下流程操作：

（1）在主菜单上选择“file based feeding”项目，然后在弹出菜单栏中选择“virtual spot detection (update)”。

（2）选择与 mélanie 结果相应的图像，这里选择“DV02041611”。

（3）提交。

这时出现一份先前建立的这张凝胶成像的虚拟蛋白点的检测目录（见图 23-7，第一步）。

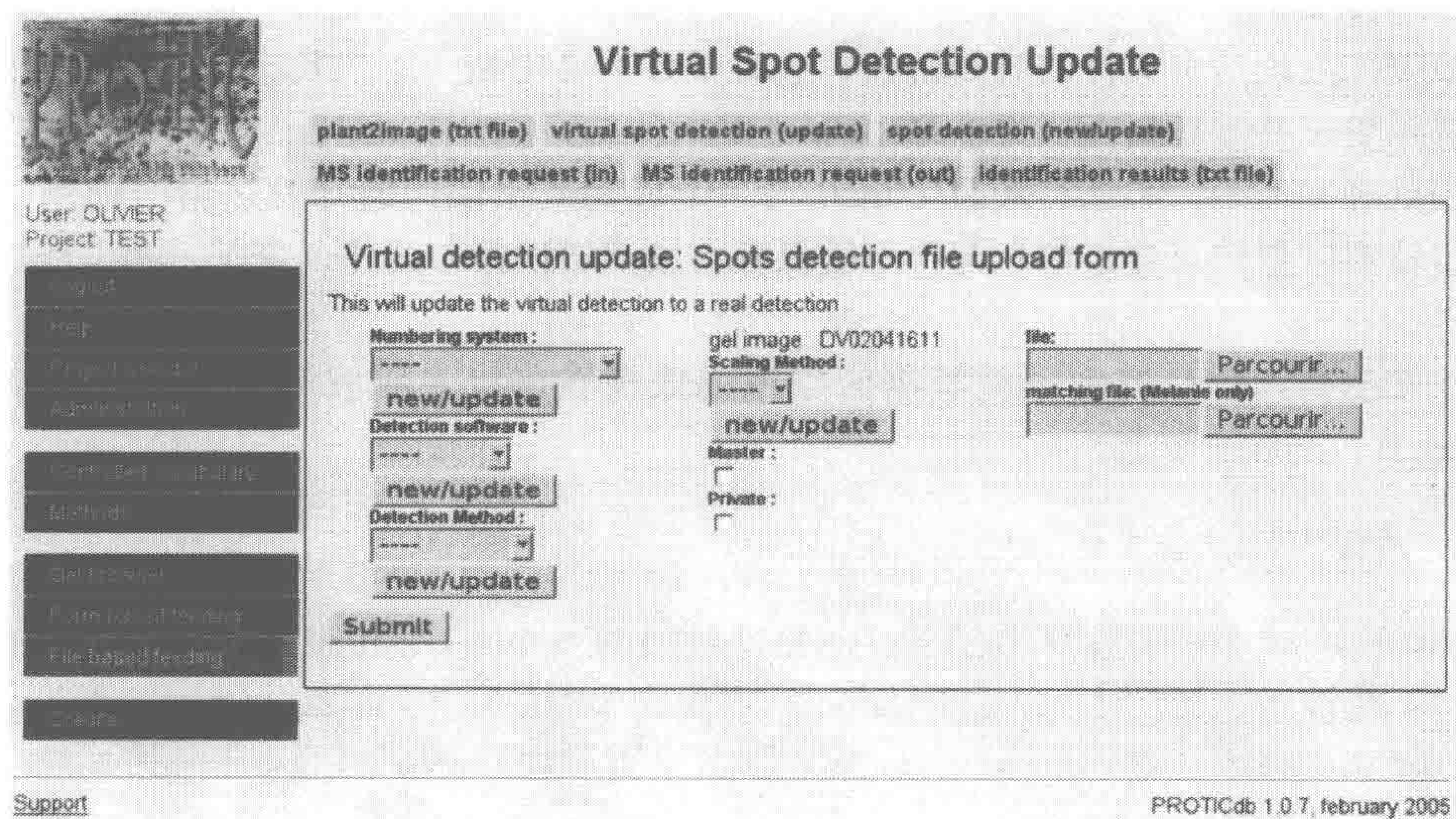


图 23-7　虚拟蛋白点检测的更新（第一步）

（4）选择要更新的虚拟蛋白质检测（本演示中，只有一个虚拟蛋白质检测可以选择）。

（5）提交。

（6）出现类似在 23. 3. 2 节 4 中描述过的“Spots detection file upload form”表单（图 23-8，第二步）。像在 23. 3. 2 节 4 中描述过的一样填写这个表单。在“demo. zip”文件夹中能找到 Mélanie 输出文件 DV02041611. txt。这张凝胶必须被指定为主凝胶。不填写“matching file”栏目。现在还不用 private/public 区域。但是，设立这一项是考虑到未来预期的数据公布政策。

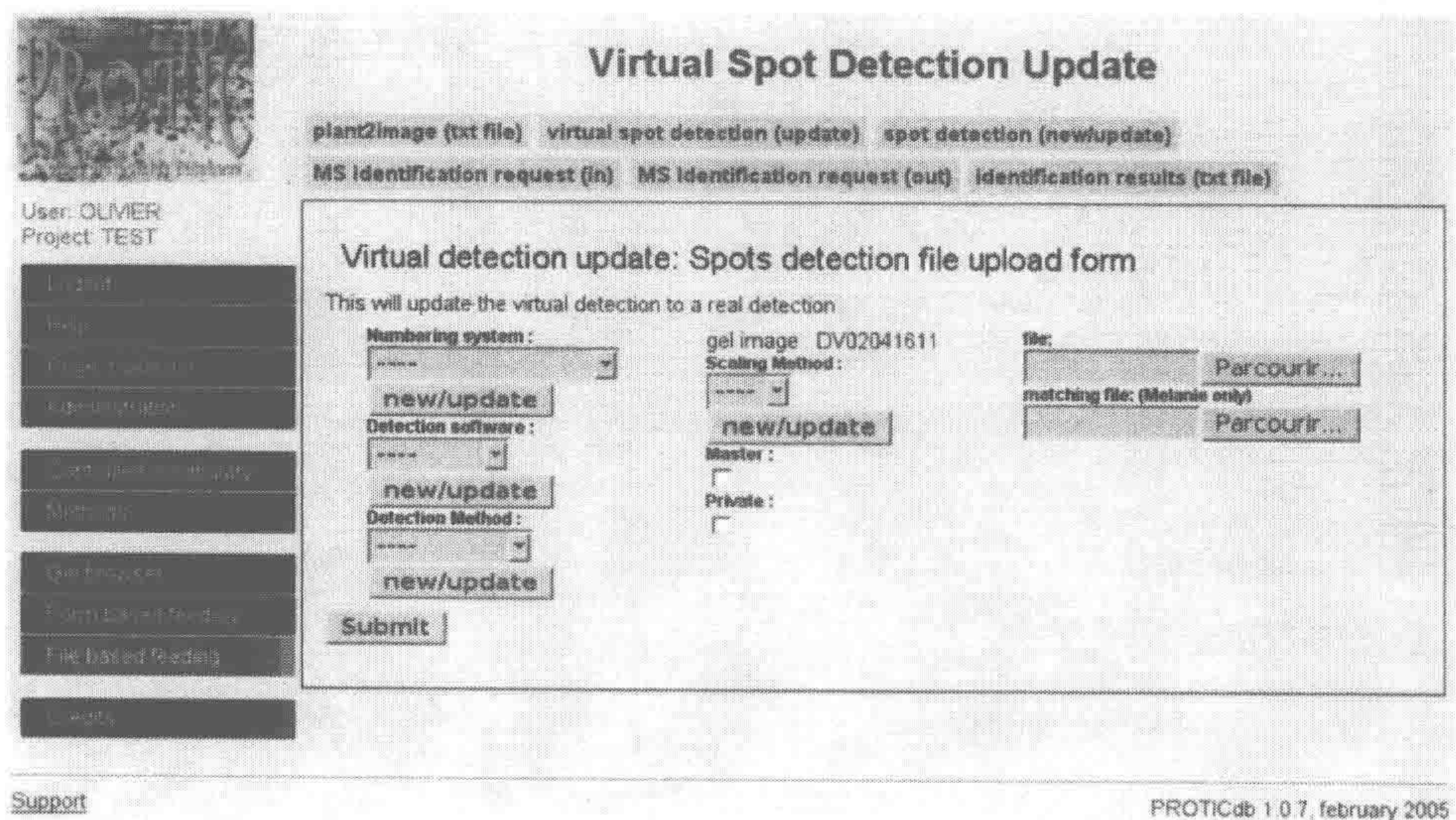


图 23-8　虚拟蛋白点检测（第二步）

（7）提交。

数据库处理这个文件的时间较长，这时千万不要中断 PROTICdb。如果发生错误，按照提示更正并重新提交（见注释 10）。

当处理完成后，系统将通过 e-mail 将一个成功或错误的通知发送给当前用户，如果发生错误，蛋白点鉴定信息都将不被保存。按照错误报告的建议更正，并重新提交一次文件。

注明蛋白点的位置和丰度数据的凝胶成像现在可以在凝胶浏览器上显示了（见 23.3.5 节，凝胶浏览器）。

4. 质谱鉴定报告文件上传

PROTICdb 兼容以制表分隔的文本格式输出的 Sequest 鉴定报告（见注释 13）。

（1）为演示，访问 http：//location _ of/your/proticdb/home/demo.php。点击“form to obtain the sequest identification demo file”，出现“Get your sequest identification demo file”表单。上传在 23.3.3 节 3 中得到的 Sequest 文件，提交表单。一封带有 Sequest 关于在 23.3.3 节 3 中创建的蛋白质点的鉴定报告邮件通过 e-mail 发送到当前用户邮箱。这最后一步只是针对演示模拟发送质谱仪的鉴定报告。

（2）选择主菜单的“File based feeding”→“identification results（文本文件）”（弹出菜单）。

（3）选择用于鉴定样品的软件。本演示选择“Sequest”。

（4）提交表格。出现“identification file upload”新表单（图 23-9）。

图 23-9　蛋白点鉴定报告文件上传窗口

（5）选择或者创建鉴定方法（为了演示，你可以创建一个虚构的方法）。

（6）选择或者创建一个用于蛋白点比对的数据库（为了演示，你可以创建一个虚构的数据库）。

（7）点击“browse”选择 Sequest 鉴定报告文件。

（8）提交。

当处理完成后，系统将通过 e-mail 将一个成功或错误的通知发送给当前用户，如果发生错误，蛋白点鉴定信息都将不被保存。按照错误报告的建议更正，并重新提交一次文件。

注明蛋白点的位置和丰度数据的凝胶成像现在可以在凝胶浏览器上显示了（见 23.3.5，凝胶浏览器）。

23.3.4　与其他用户分享数据

作为 PROTICdb 项目的拥有者，你可以很容易地与其他 PROTICdb 用户分享数据。你可以规定权限范围，以及精确地选择其他用户可以获得的权限类别，比如只读或全部权限。只有 PROTICdb 管理员才可以创建新的用户账户（见注释 14）。

（1）访问 PROTICdb 主页，并登入网页。

（2）选择主菜单上的“Administration”→“project access management”（弹出菜单）。

（3）选择你想要更新其权限的用户（见图 23-10，第一步）。

（4）点击“update”。

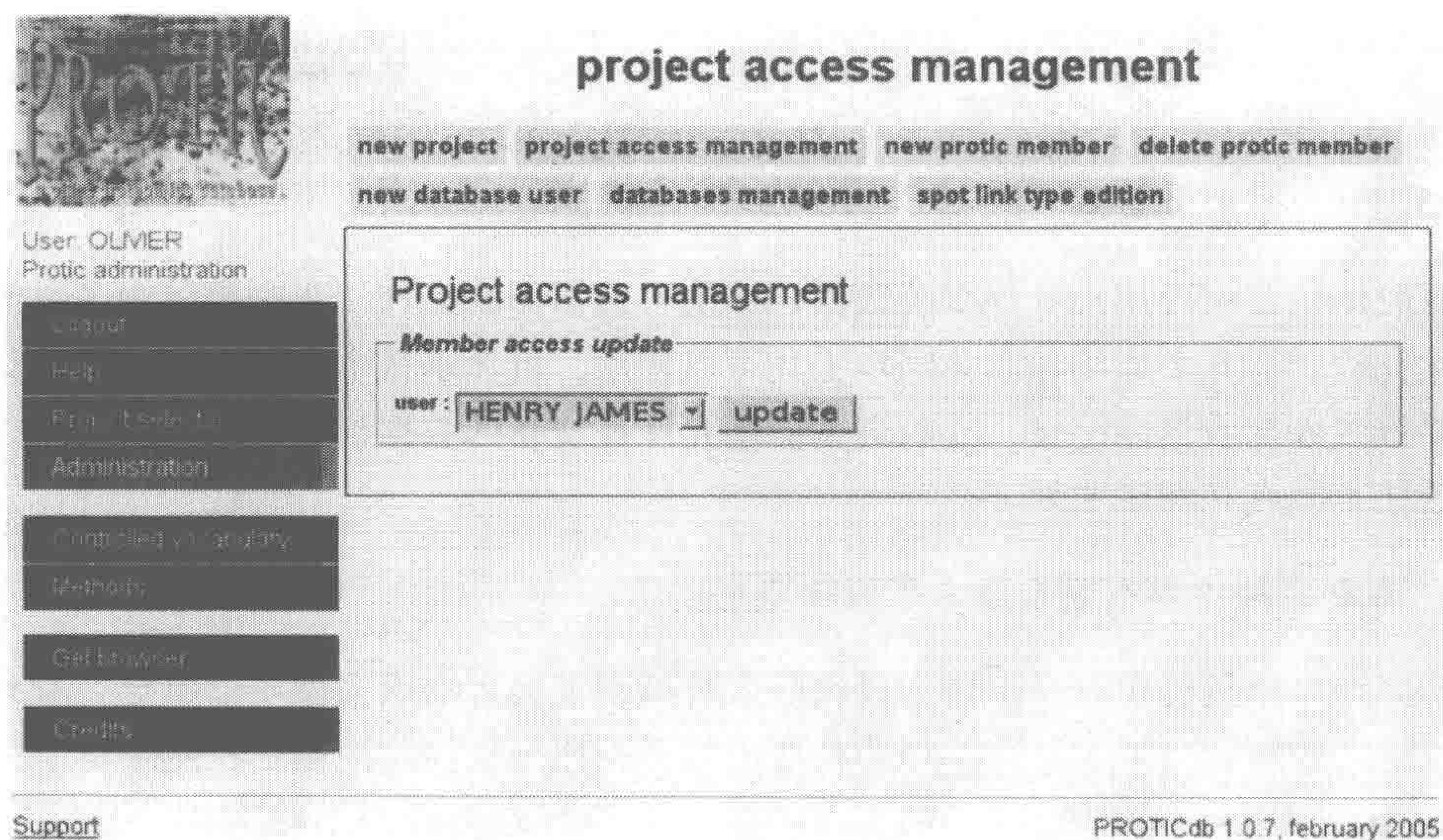


图 23-10　项目权限管理窗口（第一步）

a. 对你所拥有的每一个项目，你都可以改变其他用户的访问权限（见图 23-11，第二步）：用户类型：项目所有者或访客。项目所有者拥有所有当前项目所有者的全部权限。访客的权限有限制，默认为只读；通过“can insert”和“can update”这两项的选择有可能获得更多的授权。

图 23-11 项目权限管理窗口（第二步）。

b. Can insert：通过这个栏目，用户可以在这个项目中插入新的数据。

c. Can update：通过这个栏目，用户可以在这个项目中更新已经存在的数据。

23.3.5 凝胶浏览器

凝胶浏览器可以用来处理凝胶数据，一次可最多同时处理 4 张凝胶。为了方便凝胶的视觉比较，有几个缩放和图像同步工具可以使用。可显示每个蛋白点的总结或完整数据，并提供外部数据库链接。凝胶浏览器还允许提交新的数据到知识库。

这些不同点举例说明如下。

1. 在新凝胶中哪个蛋白质点已经被鉴定过了

新凝胶分析过程中有一步是选择此前未被鉴定过的蛋白点去做质谱鉴定。凝胶浏览器可以将新的凝胶与最多可达 3 张的其他主要凝胶进行比较并注释。在这个例子中，我们用 http：//cms. moulon. inra. fr/content/view/14/44/上的演示数据库（建议安装本地版本的 PROTICdb 数据库，并加载上面提到的演示数据集），不过，也可以用你自己的数据集，这个数据集应包含一个主胶和一个还没被分析过的凝胶（没有鉴定或是蛋白点检测数据，见注释 15）。

(1) 访问 PROTICdb 主页，并登入网页。

(2) 启动凝胶浏览器：主菜单→Gel browser（见注释 16）。项目框中包含已得到授权浏览的项目。如果有的话，可在“project summary”中找到该项目的描述。主凝胶列在“project summary”下面。每一个主凝胶后面的括号中都标有名称和数字系统标签（见注释 17）。非主凝胶列在“non-master gel”子目录中。凝胶名称后面跟着数据系统标签。这样就可以方便地确定哪一个主凝胶是被比对过的。“other gels”子目录中包含没有蛋白点检测或鉴定数据的凝胶，比如说新的凝胶。

(3) 从“projects”内框（在“other gels”中）中选择 TB02052306 这个凝胶，点击“load”按钮（见注释 18、注释 19）。

(4) 重复第三步选择 DV02041611（DLFMELANIE）。这里没有关于 TB02052306 凝胶的蛋白质点检测或鉴定信息。我们假设要鉴定这块胶上的几个蛋白点，而且还要判断质谱分析是否需要。我们将 TB02052306 与主凝胶［这里指的是 DV02041611（DLFMELANIE）］进行比较，找出先前鉴定过的蛋白点。DV02041611 中已被检测过的蛋白点被蓝色十字标记出来。在这张凝胶的上部显示，检测出 1820 个蛋白点，其中有 9 个已经被鉴定过了。要开启鉴定显示模式才能检测到哪些蛋白点已经被鉴定过了。

(5) 在菜单工具栏中选择“Mode”→“ident”或同时按 Alt i 键。已被鉴定过的蛋白点被红色十字标记。我们仔细来看看这些蛋白点。

(6) 点击 DV02041611 窗口中的任何地方，以确定它被选中。

(7) 沿着缩放滑杆移动光标，选择缩放级别 3。凝胶的显示区域在左上角的缩略图里的蓝色方框标注。这个方框可被选择，拖动缩略图可改变其显示面积。

(8) 拖动右边的 DV02041611 凝胶缩略图方框，直到有 5 个被鉴定过的蛋白点（红色十字标记）出现。拖动鼠标到每个蛋白质点上，就会显示出简要信息，包括点的编号、编号系统（见注释 17）、像素坐标，可能还会有评述和功能注释（只限红色十字标记）。还可显示更完整的信息。

(9) 在 342 号蛋白质点（第 8 步选择的左上角的红点）上看到对应的摘要框。

(10) 鼠标左键点击同一个点（342 号）（见注释 20），激活蛋白点信息框。蛋白点的数据按以下 4 个条目排列：概要、关系、鉴定和量化。每个条目对应的信息可被不断充实。其中鉴定包括质谱的详细数据。

(11) 开发鉴定、质谱详细数据和下一个子目录。从质谱数据分析得到了每个匹配结果，首先得到的 3 个匹配条目是序列定义、全球鉴定分值（质谱匹配分值）和序列存取编号，这个编号与对应的数据库链接。

(12) 用鼠标左键双击 342 号蛋白点的“696997/entrez”链接，进行第一次比对。一个显示 AAF34134 NCBI Entrez 数据库序列报告的新窗口跳出（见注释 21）。可能的话，还会显示相应的 Swiss-Prot 关键词和 GO 条款。还可以直接链接到 EBI GO Browser QuickGO。下一个可获得的信息关于可以用来进行比对的肽段。包括多肽的序列及其分值（Seques 或 Mascot 格式）。根据提交给数据库的信息，量化项目可提供蛋白点的面积，体积或峰高等值。蛋白点寻找系统可帮助我们在一张凝胶中定位一个蛋白点。

（13）用鼠标左键点击 DV02041611 凝胶窗口，以确定这个窗口被激活。

（14）从菜单工具栏中选择 Tools→Find 或同时按 Ctrl f 键。

（15）输入数字 1647，点击 OK。DV02041611 被放大，1647 号蛋白质点被一个黄色的闪动环标记。我们现在可以进行 DV02041611 和 TB02052306 的比较。

（16）使用右下角的滚动杆将 1647 号蛋白点移动到凝胶图像的中心部位。

（17）从菜单工具栏中选择 Tools→Synchronize 或同时按 Ctrl s（见注释 22）。两张凝胶的图像出现在同一个视野里。如果这两张凝胶图像差别很大，将无法显示，可能需要使用滚动杆调整这两张凝胶图像。

（18）从菜单工具栏中选择 Tools，复选 Link 或同时按 Ctrl l。

（19）拖动两个缩略图中的一个蓝色方框。这两张凝胶图像显示区域要被同时更新，以保证其同步。但是，本地凝胶可能会导致同步丢失，可通过滚动杆手动调节。

（20）回到 1647 号蛋白点区域（DV02041611），重复第 13 步到第 17 步的过程。这里很容易发现 TB02052306 中的蛋白点与 DV02041611 中的 1647 号蛋白点相对应。这个点就不需要再鉴定，也不必切下来去做质谱实验，除非用户认为质谱输出数据（可从蛋白点信息框中看到）的质量不高。

2. 知识库的填充

知识库是用来存储专家们进行凝胶图像比对所得到的结果。存储同一张凝胶上两个蛋白点或是两张主胶上的两个蛋白点的二元关系。例如，比对、物理作用、等位性、转导后修饰状态等。用户可以自由创建任何关系类型。当两个蛋白点相互关联，它们就可共享像鉴定结果这样的信息。PROTICdb 会根据从知识库中搜索得到的相关性，自动建立蛋白点网络。例如，如果点 A 与点 B 链接，而点 B 又与点 C 链接，那么数据库会建议点 A 和点 C 链接。这样可使用户得到新的信息。如果点 A 是唯一一个被鉴定过的，那么数据库将建议相同的鉴定结果给点 B 和 C，在知识库不断完善和充实时，越来越多的信息被这几个蛋白点共享，使得蛋白点的注释被不断地更新（包括原来的实验结果），因此可避免不必要的质谱分析和建立新的假设。

（1）访问 PROTICdb 主页，并登入网页。

（2）开启凝胶浏览器：主菜单→凝胶浏览器（见注释 16）。

（3）从“Projects”内框中选择主凝胶 DV02041611（DLFMELANIE），点击“Load”按钮（见注释 18、注释 19）。

（4）重复第 3 步骤，选择 DV02121001（DLFM02121001）。

（5）激活 Ident，显示模式：菜单工具栏→Mode→Ident 或同时按 Alt i。

（6）鼠标左键单击 DV02041611 凝胶窗口，激活它。

（7）寻找 1647 号蛋白点：主菜单→Tools→Find 或同时按 Ctrl f 键，键入 1647，点 OK。1647 号蛋白点被黄色闪光圈标记。

（8）如果需要，用移动滚动杆将这个点移到窗口中央。

（9）从菜单工具栏中选择 Tools→Synchronize 或同时按 Ctrl s（见注释 22）。尽管是同步的，两个显示区域不相互对应。凝胶 DV02121001 的右边区域就在显示区上面。

(10) 移动滚动杆调整凝胶 DV02121001 显示区使它与第二块胶相对应。为了做到这点，参考 DV02041611 (DLFMELANIE) 凝胶上的红色点和定位在这块胶左边的 5 个其他蛋白点，去寻找在 DV02121001 胶上的相应的蛋白点。你可能只需移动右边的滚动杆。如果没找到正确位置，那么在 DV02121001 凝胶中寻找编号为 1752 的蛋白点 (见第 7 步) 然后把这个点移到窗口中心位置。现在两张凝胶图像同步了，你可以发现红点 (DV02041611 胶上的 1647 号点) 可以与 DV02041611 上的 1757 号点进行比对。你也会发现 DV02041611 上的 1757 号点还没被鉴定。我们来说说这两个点的匹配关系吧。申请表的标题栏 (在主窗口的最上边) 显示 (你用了许多演示，如果可能尽量使用同义词) 知识库填充工具的设置：关联模式设置为 OFF，关联方式设置为手动比对。我们首先要激活关联模式。

(11) 从菜单工具栏中选择 Association，然后复选 Association mode 或同时按 Ctrl a。

现在 Association mode 设置为 ON。新的进入关系——手动比对已被设置。你可以通过默认的方式检查所有能使用的关系。这个菜单是用户可以自行配置的 (见 PROTICdb 管理网站上蛋白点链接编辑页)。

(12) 单击 DV02041611 凝胶窗口，激活它。

(13) 右键点击红色点 (在凝胶 DV02041611 上的 1647 号点)。这个点会被红圈圈起来。

(14) 单击 DV02121001 凝胶窗口，激活它。

(15) 右键点击比对点 (凝胶 DV02121001 上的 1757 号点)。该点被红圈圈定，同时跳出确认框。你可以为这个新关系添加注释，然后点 OK 生效。

(16) 点击 OK。一个确认框出现，证实新的关系已被成功地注册到数据库。

(17) 从菜单工具栏中选择 Mode→Relation，或同时按 Alt r 键。这次只有包含至少一个关系的点被蓝色十字标记。

(18) 当移动鼠标到两个链接的蛋白点之一上时，与这个点链接的每个点的十字标记的颜色都变成橙色 (在另一块胶上有一个匹配的蛋白点)。当鼠标点到这些点中的一个时，只有包括在同一个网络中的点显示橙色 (图 23-12)。你可以通过声明一个新的关系，确认这些数据，这样就可以扩大点的网络。

(19) 关闭 DV02121001 凝胶，再重新开启 (同时按 Alt p 键，或按照第 3 和第 5 步的描述操作)。

(20) 在 DV02121001 凝胶中寻找 1757 号蛋白点 (按照第 7 步描述操作)。

(21) 同步显示这两个凝胶图像 (按照第 8 到 10 步中的描述操作)。

(22) 确定 ident 显示方式是被激活的 (见第 5 步)。凝胶信息摘要显示在每一个凝胶窗口的右上角，报告被检测和鉴定过的蛋白点的数目。在 DV02041611 凝胶上，用红十字标记的点代表有 9 个点已被鉴定过。在 DV02121001 (DLFM02121001) 凝胶上，尽管有一个点被红十字标记 1386 号蛋白点，但没有蛋白点被鉴定过。这些明显相互矛盾的数据说明了蛋白点的网络设施：DV02121001 凝胶上的 1757 号点是被鉴定出来的 (因为已经用红色十字标出)，因为它与另一个已被鉴定出来的点关联 (在这个实验中先前创建的关系)。然而，在右上角的摘要栏里只报告那些已经过质谱分析的点，这样

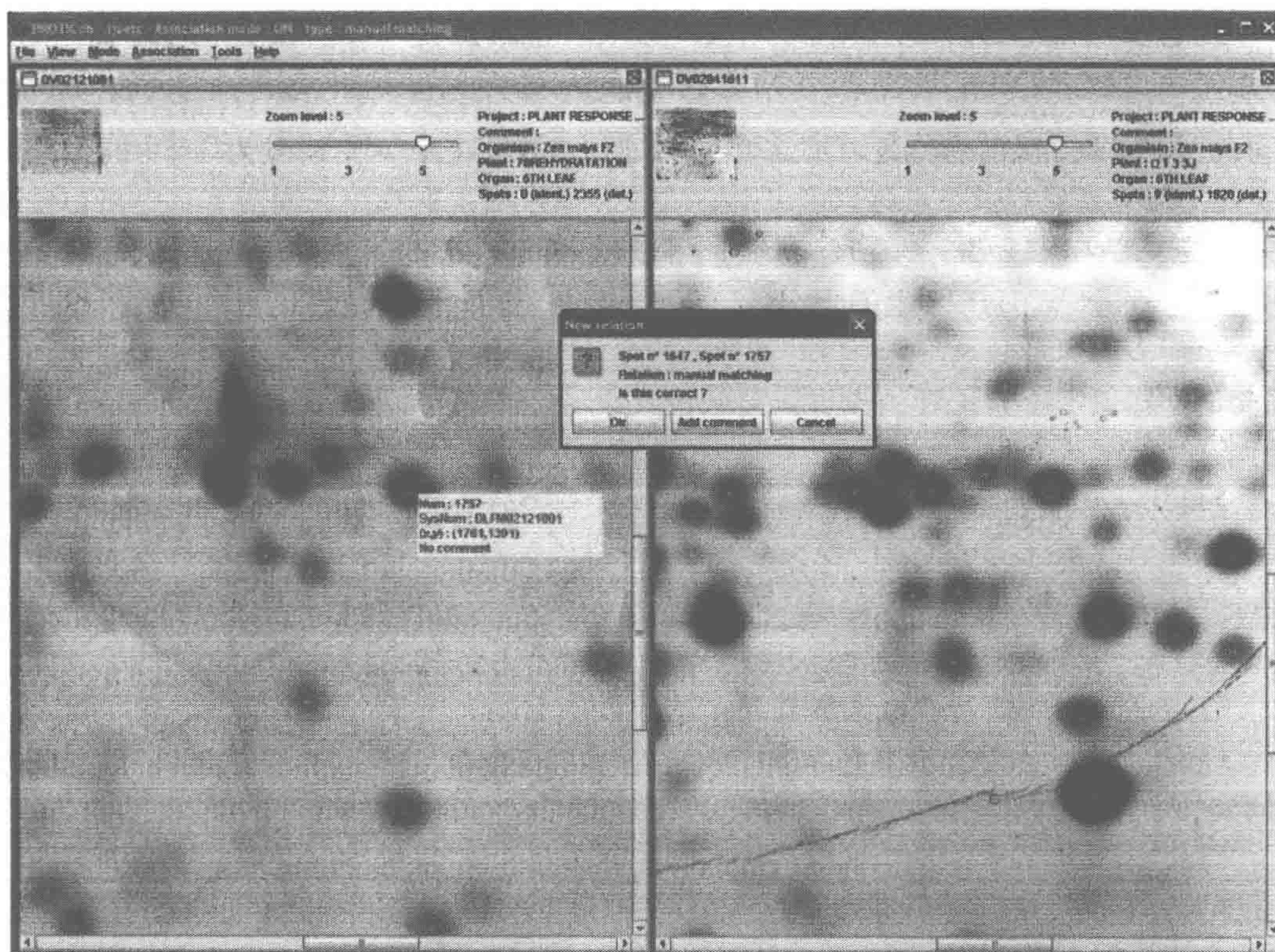


图 23-12　PROTICdb 知识库填充图表

PROTICdb 通过自动知识库分析工具更新蛋白点的注释。

(23) 把鼠标移到 DV02121001 凝胶上的 1757 号红点上。鉴定结果以蓝色文本文件输出，意味着这个注释是从另一个相关点的信息中推导出来的。在鉴定结论的上方显示这个特定的关系。

(24) 左键点击 DV02121001 凝胶上的 1757 号红色点。显示点的信息内框。

(25) 完善关系和鉴定目录，关系随着建议的鉴定信息一起报告。出现一个如何得到这个鉴定的警示信息。

(26) 与 DV02041611 凝胶上的 1647 号点进行比对。

3. 量化数据输出

点的量化数据（面积、峰高或体积）可以列表文件格式输出，而且很容易导入到任何电子制表软件或统计包中。

(1) 访问 PROTICdb 主页，并登录网页。

(2) 开启凝胶浏览器，主菜单→凝胶浏览（见注释 16）。

(3) 从菜单工具栏中，选择 Tools→Projects data export 或同时按 Ctrl d。跳出数据输出框（在数据输出之前没必要加载任何凝胶图像）。

(4) 选择你要输出数据的项目。

(5) 选择编号系统（见注释17)。在一个既定的编号系统内比较那些共享相同号码的蛋白点才有意义。选定了编号系统，就会显示一张数据集表格。每张凝胶的蛋白点的检测方法名称和量化方法名称都会被标示出来。用户可以导出用相同方法处理的数据。

(6) 通过复选相应的内容框，选择将要被导出的数据，然后点击OK。

(7) 选择面积、体积或峰高。你也可以选择一个缺失数据的代码。点击OK。

(8) 选择结果导出方法：表格、剪贴板或文件。行显示点，列显示胶（条件)。

23.4　注　　释

(1) 在软件处理字符串时，尽量避免拼写错误和微小的偏差，所有单词用于PROTICdb存储时均为大写字母（方法名称、可控词汇、项目关键词等)。注意，这不适用于物种名称，物种名称必须完全符合NCBI分类格式，并区分大小写。

(2) 我们鼓励用户仔细检查列表以免创建同义词汇。如果在这一步发现错误拼写，可以通过点击更新按钮更正。再次提醒注意：更新会被用于整个数据库。数据库的第一个用户必须创建新的条款。

(3) 工作区顶部的先前被记录过的植物可以被选定更新。每一个其他数据提交表格中都有这个数据“更新”工具。

(4) 在一个PROTICdb实验中，植物名称必须是唯一的。举例说明，在一个项目中可能有两个叫“plant 1”的植物，这两个植物一定不属于相同的实验。一个PROTICdb实验可被视为是一群独有植物的名称。

(5) 在一个项目中建立的方法可以被用于所有其他的数据库项目。在主菜单“methods”链接中的方法可被创建、济览和更新。每个方法包含一个名称、一个描述（必须有的）和一个注释。公开或非公开区域将在PROTICdb未来的版本中应用，但现在应该将其考虑。

(6) 如果一个必填项未填写，或者没有按照规定格式输入数据，表格将被拒绝。根据建议更正表格，重新提交。

(7) 另外，你可将混合样品看成一个单独的样品（在“Protein sample”窗口按这种方式输入)。在这种情况下，尽管是一个共迁移实验，也只填写一个蛋白质样品。

(8) 如果初始文件不是jpeg格式，必须进行转换。凝胶成像文件必须与在检测软件中使用的原始文件的分辨率（像素的宽度、高度）一致：图像点坐标必须以像素表示。使用图像处理软件将图像文件从tiff格式转换到jpeg格式。XnView（http：//www. xnview. com/）或The GIMP（http：//www. gimp. org/）可获得免费的软件。压缩到60%的jpeg文件还可在凝胶浏览器上看到图像。

(9) 打开Mélanie（或Image Master 5.0）软件菜单中的“Reports”主菜单→“Spot Report”→Choose columns→Save as text（*.txt)，就可以产生一个点报告文件，或参照Mélanie说明书。

(10) 当向PROTICdb提交数据（植物图像、检测结果、鉴定结果等）时，有几个

检查步骤来保证数据的一致性。根据数据量的大小，可能需要消耗较长的时间（数秒到数分钟）。在 PROTICdb 处理数据的时候不要中断操作；出现问题将通过电子邮件通知你，或者从你的浏览器上了解。如果发生错误，更正你的文件然后再次全部提交，直到 PROTICdb 发出一个成功的邮件信息。

（11）用来提交植物图像数据或微孔板图的 Excel 模板文件必须是微软 Excel 模板格式，不过，你可以使用其他任何软件打开，比如 OpenOffice. org，StarOffice，ClarisWorks 等。在把你的表格提交到 PROTICdb 之前将其保存为“制表符分隔的文本”格式文件。

（12）要使用 Sequest tool（Xcalibur 1. 3）这个工具处理文件，选择“sequence setup”→“new”→“file”→“import sequence。”

（13）从 Sequest（Bioworks 3. 1）软件中：显示鉴定结果（蛋白和肽的列表），点击鼠标右键，选择“export”→Excel。应用 Excel，保存表格为“制表符分隔的文本”格式文件。

（14）PROTICdb 数据库管理员有权利建新账号。按照下列顺序操作创建新账户：“main menu”→“administration”→“new database user,”填写表格，然后提交。在“new protic member”（弹出菜单）中为新用户指派一个 PROTICdb 角色（访客，管理员或用户）。

（15）一个凝胶图像的最低设置必须确保其正确显示、数据一致性，以及避免加载不完整的图像信息。所需的资料包括关于实验流程，从植物样品到二维双向电泳实验和图像数字化处理（JPE 格式）。凝胶浏览器提供显示那些相应的项目中的“未分析凝胶”的凝胶图像。

（16）正如在凝胶图像可视化的讨论中所说的，必须要凝胶浏览器这样一个设备外连到演示 PostgreSQL 数据库（host：moulon. inra. fr port：5432）。你的个人或外部防火墙可能阻止这样的连接。检查一下是否连接失败。未来版本 PROTICdb 将不会被防火墙阻止，而且会尽量降低网络带宽资源的消耗。凝胶浏览器是一个 Java 小程序，要求 1. 4 以上 Java 版本。

（17）编号系统是一套将凝胶匹配到同一个主凝胶上的名称（在 pdquest 软件中叫做 matchset）。检索凝胶的名称，可以快速鉴别具有相同编号系统的凝胶。

（18）由于内存不足可能会造成下载第四个凝胶图像失败。JAVA 配置的默认内存为 64Mo（最大值）。按照以下步骤操作可增加这个参数（Windows 系统的计算机）：控制面板→JAVA 插件控制面板→JAVA 选项卡→Java Applet 运行时间设置→view→双击 JAVA 运行时间参数的空白项，输入“-Xms128m -Xmx128m”（不键入引号）。点击 OK，Apply，关闭 JAVA 和 Windows 控制面板。然后关闭凝胶浏览器，重启凝胶浏览器。这可提高 JAVA 的内存容量到 128Mo。不要输入超过你系统的总物理内存量。有关更多的关于 Java 内存的优化问题，请参考 http://java. sun. com/docs/hotspot/index. html 。

（19）要耐心，根据服务器和互联网的情况，下载可能最多需要 10min。因此推荐使用当地数据库（载入时间通常下降到不足 1min）。

（20）如果 DV02041611 凝胶窗口未被激活，可能需要两次左键点击，第一次左键点击激活这个窗口，第二次点击启动蛋白点的信息框。

（21）弹出窗口拦截工具可能会干扰链接过程，所以对 PROTICdb 网站停止使用这类工具。

（22）取决于所安装的 Java 版本，可能需要使用两次同步命令来取得正确的结果。

致谢：

我们感谢 Delphine Vincent 仔细校阅本文稿。

参 考 文 献

1. Görg, A., Weiss, and Dunn M. J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **4,** 3665–4036.
2. Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrin, J. , Mock H. P., and Rossignol M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* **4,** 285–298.
3. Zhu, H., Bilgin, M., and Snyder M. (2003) Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* **72,** 783–812.
4. Pandey, A. and Mann, M. (2000) proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405,** 837–846.
5. Ferry-Dumazet H., Houel G., Montalent P., et al. (2005) PROTICdb: a web-based application to store, track, query and compare plant proteome data *Proteomics* **5,** 2069–2081.
6. Harris M. A., Clark J., Ireland A., et al. (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* **132,** D258–D261.

第24章　磷酸化蛋白鉴定

Maria V. Turkina 和 Alexander V. Vener

摘要　可逆的蛋白质的磷酸化作用参与植物细胞生理学的所有活动。由于用于研究磷酸化蛋白质的蛋白质组学和质谱技术的应用，使得这项具有高度挑战性的任务——揭示和分析植物中动态蛋白磷酸化网络的工作最近才开始成为可能的。蛋白质胰蛋白酶的剪切，色谱层析分离富含磷酸化肽段，质谱裂解和磷酸化肽段的序列分析为建立鉴定大部分目前已知的植物体内磷酸化蛋白质的实验方法打下了基础。当用胰蛋白酶消化单独分离出来的组分或不同的植物细胞器的蛋白质时，这个方法是最有效的。固相金属螯合亲和层析（IMAC）对富集复杂的蛋白质消化物被甲基化后生成的磷酸肽很有用。以下分离出来的磷酸肽的串联质谱分析得到了磷酸化蛋白质的鉴定和生物体内磷酸化位点的定位。个体蛋白质中修饰位点的磷酸化程度的相对定量分析可借助稳定同位素标记技术或专用的液相色谱-质谱方法完成。

关键词　固相金属螯合亲和层析（IMAC）；质谱分析；蛋白磷酸化；磷蛋白；磷酸肽；肽测序

24.1　前　　言

鉴定植物磷酸化蛋白质的实验方法主要有以下5种：①放射性同位素^{32}P或^{33}P标记[1]；②不同蛋白质电泳迁移率的检测[2,3]；③磷酰氨基酸特异性抗体的免疫分析[3,4]；④磷酸化诱导增加的完整蛋白质质量的质谱分析[5,6]；⑤蛋白质水解后得到的磷酸肽的鉴定及序列分析[7-9]。最近已经报道了以上所列的此种技术用于检测植物类囊体膜上磷酸化蛋白的实验方法[10]。因此，本章将不再进一步讨论以上①～④的实验方法，重点讨论最有效率和最有用的第⑤种实验方法。

这一技术基于蛋白质组分的胰蛋白酶消化以及肽段（不是蛋白质）的进一步分离，蛋白质的水解消化应该在不同的膜分离制备物或植物细胞可溶性组分中进行。通过固相金属螯合亲和层析（IMAC）富集得到的肽混合物中的磷酸肽，用串联质谱对分离到的磷酸肽进行序列分析。这种方法能识别体内磷酸化蛋白质及其蛋白质序列磷酸化的准确位点。该方法对最近完成的植物以及其他物种中蛋白质磷酸化位点定位图作出了主要的贡献[11]。这种方法关键部分就是磷酸化肽段的质谱序列分析。一旦蛋白质磷酸化位点被定位，接下来的蛋白质磷酸化程度的相对定量分析可通过以下介绍的实验方法中的两个不同的实验步骤来完成，在此需要提醒大家的是，这里所介绍的成功应用以质谱为基础的磷酸肽鉴定的方法，仅限于已经完成基因组测序的植物物种的蛋白质磷酸化鉴定和分析。

24.2 材　　料

（1）分别配制新鲜的 25mmol/L NH_4HCO_3 和 10mmol/L NaF 溶液。

（2）二硫苏糖醇（DTT）。

（3）碘代乙酰胺，它在溶液中不稳定，因此要用前现配。

（4）Sequencing-grade modified trypsin（测序级胰蛋白酶）（Promega 公司，Madison，WI）。

（5）GELoader 枪头（Eppendorf 公司，Hamburg，Germany）。

（6）Chelating Sepharose Fast Flow（螯合琼脂糖凝胶层析介质）（Amersham Biosciences 公司，Uppsala，Sweden）。

（7）配制新鲜的 0.1mol/L $FeCl_3$ 溶液。

（8）分别配制新鲜的 20mmol/L Na_2HPO_4 和 20%（*V/V*）乙腈水溶液。

（9）配制新鲜的 0.1%（*V/V*）乙酸溶液。

（10）液相色谱级等梯度乙腈。

（11）ZipTipC18 层析柱（Millipore 公司、Bedford、MA、USA）。

（12）光谱用三氟乙酸（TFA）。

（13）甲酸。

（14）乙酰氯。

（15）高效液相色谱用无水甲醇梯度。

（16）无水甲醇-d_3。

24.3 方　　法

这里所述的方法概括为下列几个步骤：胰蛋白酶水解消化膜和可溶性组分中的蛋白质（见 24.3.1）；固相金属螯合亲和层析（IMAC）富集磷酸肽（见 24.3.2）；用串联质谱对磷酸肽进行鉴定和测序（见 24.3.3）；使用稳定同位素标记的磷酸肽的相对定量分析（见 24.3.4）；用液相色谱-质谱（LC-MS）确定蛋白磷酸化率（见 24.3.5）。

24.3.1　细胞亚组分的胰蛋白酶消化酶解

1. 膜组分的胰蛋白酶消化酶解

膜表面结合肽的分离：

（1）用含 10mmol/L NaF（见注释 2）的 25mmol/L NH_4HCO_3（见注释 1）溶液清洗分离出来的膜制备物两次。

（2）用含 10mmol/L NaF 的 25mmol/L NH_4HCO_3 悬浮膜制备物，得到总蛋白浓度为 10～15mg/ml（或者光合膜的叶绿素浓度为 2～3mg/ml）。

(3) 在膜悬液中加入 DTT 至终浓度为 1mmol/L，加碘代乙酰胺至终浓度为 3mmol/L，还原和烷基化半胱氨酸残基（见注释 3）。

(4) 用测序级胰蛋白酶 [5μg 胰蛋白酶/mg 叶绿素，或 1μg 胰蛋白酶/mg 蛋白（见注释 4)]，22℃消化酶解膜悬液 3h（见注释 5）。

(5) 冻、融消化酶解物，15 000*g* 或更高转速离心 20min。

含有膜中释放出来的肽段的上清液可直接用来质谱分析，或通过 IMAC 富集磷酸肽。

2. 可溶性组分的胰蛋白酶消化酶解

(1) 用含 10mmol/L NaF 的 25mmol/L NH_4HCO_3 悬浮蛋白质，蛋白质终浓度为 1～10mg/ml。

(2) 在悬液中加入 DTT 至终浓度为 1mmol/L，加碘代乙酰胺至终浓度为 3mmol/L，还原和烷基化半胱氨酸残基。

(3) 用测序级胰蛋白酶在 37℃消化 24h。酶的添加量应为蛋白质总量的 1%～3%（通常 100μg 蛋白质加 2μg 胰蛋白酶）。

24.3.2　用固相金属螯合亲和层析法富集磷酸肽

富集的磷酸肽有助于之后对其进行质谱鉴定和测序。由于带负电荷的含磷基团与 Fe (III) 结合，磷酸肽的富集可在固相金属螯合亲和层析柱中经过亲和层析富集。酸性条件下（MeOH/HCl）自由羧基酯化会掩饰负责非特异性结合所有酸性肽的羧基基团的负电荷，因此，酯化，尤其是甲基化能增加磷酸肽的特异性富集[12]。

1. 胰蛋白酶酶解多肽的甲基化

(1) 真空离心干燥从 300μg 蛋白质样品中（或 50μg 光合膜叶绿素）获得的胰蛋白酶消化肽。

(2) 在 500μl 甲醇溶液中不断搅拌滴加 80μl 乙酰氯，配制 2mol/L 盐酸甲醇溶液。滴加 300μl 2mol/L 盐酸甲醇溶液到被真空离心干燥的肽样品中。室温下温浴 2h 进行酯化反应。

(3) 真空离心干燥酯化了的肽。

2. IMAC

(1) 将 8μl 螯合琼脂糖凝胶（Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham)）珠子悬浮液填装到 GELoader 枪头，制作微型柱。

(2) 用 20μl 0.1% (*V/V*) 乙酸冲洗柱子两次，并用 100μl 0.1mol/L $FeCl_3$ 为柱子挂上电荷（见注释 6）。

(3) 用 20μl 0.1% (*V/V*) 乙酸冲洗柱子将未结合的 $FeCl_3$ 冲洗掉。

(4) 将甲基化的胰蛋白酶消化肽样品溶解在 5μl 甲醇/水/乙腈（1∶1∶1，*V/V*）中，将溶液加载到柱子上，孵育 15min。

（5）用 20μl 0.1%（V/V）乙酸冲洗柱子两次。

（6）用 20μl 0.1%（V/V）乙酸，20%乙腈水溶液冲洗柱子两次。

（7）用 20μl 20% 乙腈水溶液（V/V）冲洗柱子两次。

（8）用 40μl 20mmol/L Na_2HPO_4，20%乙腈水溶液洗脱磷酸肽。

通过 IMAC 富集的磷酸肽可以直接在 LC-MS 上分析。但是，如果不经过预先的液相色谱（LC）分离，而直接进行电喷雾质谱（ESI-MS）分析的话，磷酸肽要先用 ZipTipC_{18}（Millipore 公司）柱子进行脱盐处理。

3. 用 ZipTipC_{18} 对磷酸肽脱盐处理

（1）将从 IMAC 洗脱下来的肽样品经真空离心干燥，去除乙腈，用 10μl 0.1% TFA 水溶液溶解干燥的肽样品。

（2）用 10μl 移液器吸取 50%的乙腈水溶液润湿 ZipTipC_{18}柱子，反复润湿 3 次。

（3）用移液器吸取 0.1% TFA 水溶液平衡 ZipTip 柱子，反复平衡 3 次。

（4）吸取肽样品加到 ZipTip 柱子上，让肽样品结合到柱子上，重复加样 10 次，使肽样品最大程度地结合在柱子上。

（5）用 0.1% TFA 水溶液清洗 ZipTip 柱子。重复冲洗 5 次。

（6）用 10μl 50%的乙腈水溶液将脱盐的肽样品洗脱到一只干净的试管中（见注释 7）。反复洗脱 10 个循环。

24.3.3　用电喷雾质谱进行磷酸肽测序

（1）质谱分析是在一个配备了纳升电离源的混合（四极杆-时间飞行）串联质谱仪上进行的。

（2）将 2μl 经过 ZipTips 柱子，用 50%乙腈水溶液和 1%甲酸（见注释 8）脱盐的肽样品上样到纳升电喷雾毛细管（见 24.3.2 节 2）。

（3）先记录阳离子模式完全扫描谱。

（4）这个扫描谱上显示出的每个肽离子（见注释 9）是受到碰撞诱导解离产生的。

（5）裂解谱通过检测磷酸中性丢失特征信号，鉴定磷酸肽以及确定磷酸化残基。在碰撞引发裂解后，磷酰基团和一个肽之间形成的磷酯键较肽键不稳定，导致带正电荷的含磷酸化残基的肽离子发生磷酸 H_3PO_4（98Da）中性丢失[7,13]。磷酸中性丢失发生在选择母离子和含有磷酸化残基的碎片离子上。

（6）质谱图要对以下片段的谱值进行验证：含磷酰基（含磷酸化残基的肽段增加了 80Da）的 Y（C 端）和 B（N 端）碎片离子和发生 98Da 中性丢失的卫星碎片离子（丢失磷酸的肽段）。

（7）同时，质谱图还要对从不含磷酸化残基的肽段发出的互补离子信号进行验证，对每个频谱的解释可以完成包括磷酸化位点的肽序列分析工作（甚至从头测序工作）。

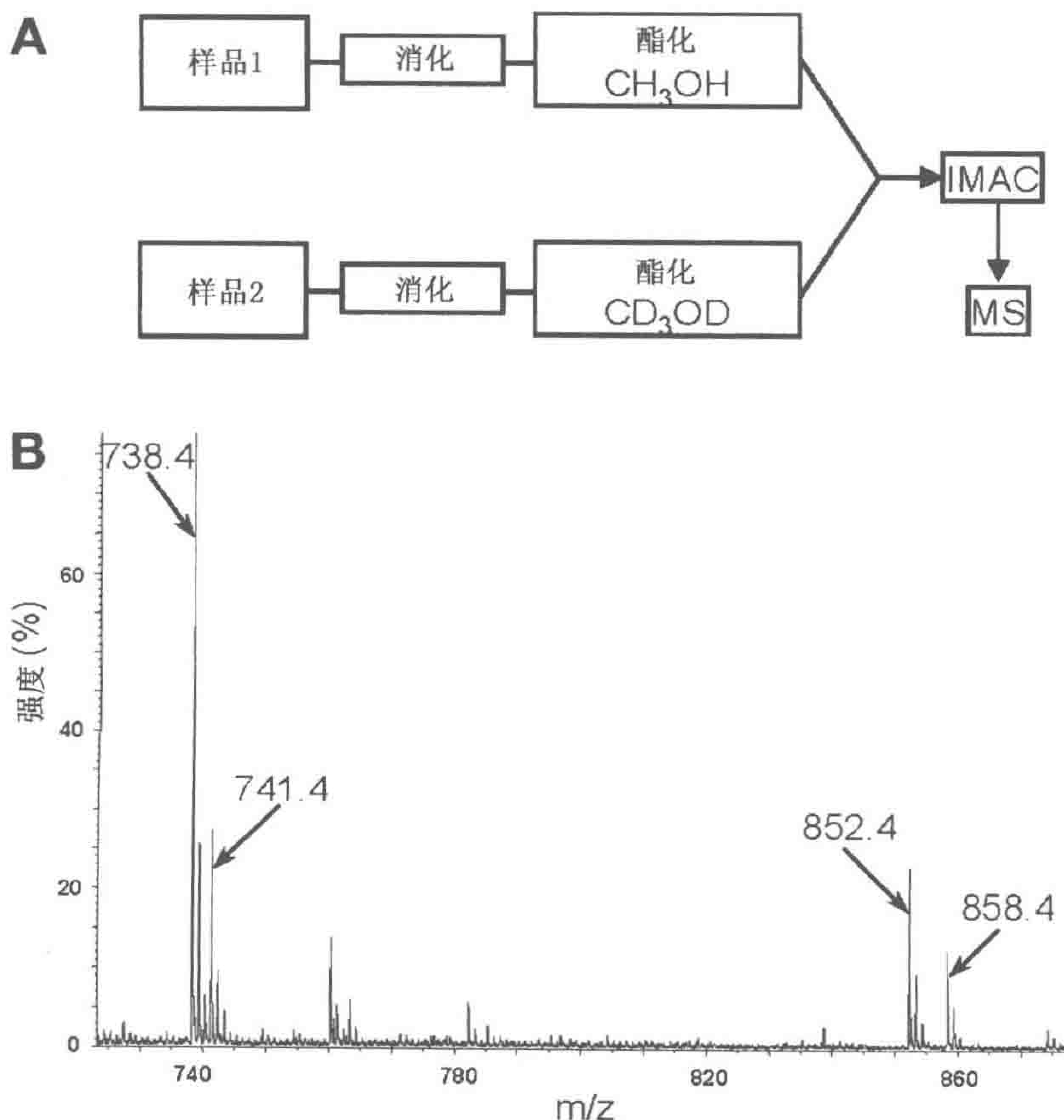
（8）肽的鉴定也可以通过把实验中得到的裂解片段谱图提交到一个使用 Mascot 服务器的数据库中进行检索（http：//www.matrixscience.com/）。设置 Mascot MS/MS 离子检索程序可以让肽的甲基化和磷酸化包括在检索范围内。

24.3.4 磷酸化肽的相对定量

肽的性质及其电离特性决定用质谱检测的肽离子强度。因此，不同肽段的定量比较是不可能的。但是，质谱检测结合稳定同位素标记技术可以用来对两个完全不同的蛋白质样品进行蛋白磷酸化的相对定量分析。这种实验的路线图见图 24-1A。通过盐酸甲醇酯化同时标记两个等量肽样品，它们是在不同条件下生长的植物的同一组织或细胞组分中获得蛋白质的胰蛋白酶消化酶解产物，用甲醇-d_0 标记一个样本，甲醇-d_3 标记另一个样本，分别生成轻、重标记的两个肽段[14,15]。合并这两个样品，运行 IMAC 获得富含磷酸肽组分。质谱检测获得轻、重同位素标记肽（图 24-1B 和 C）比例的结果。轻、重同位素标记的肽段的峰面积总和的比值与不同条件下的蛋白质特定位点的磷酸化的差异相关。

（1）真空离心干燥胰蛋白酶酶解肽段样品，它是生长在两个不同条件下的植物的相同细胞组分的 150μg 蛋白质的胰蛋白酶酶解产物。

（2）边搅拌，边滴加 80μl 乙酰氯到 500μl 甲醇-d_0 或者 500μl 氘代甲醇-d_3，制备 2mol/L 盐酸甲醇轻、重标记溶液。加入 200μL 2mol/L 盐酸甲醇-d_0 到干燥肽样品 1 中，加入 200μl 盐酸氘代甲醇-d_3 到干燥的肽样品 2 中。室温下温育混合物 2h，进行酯化反应。



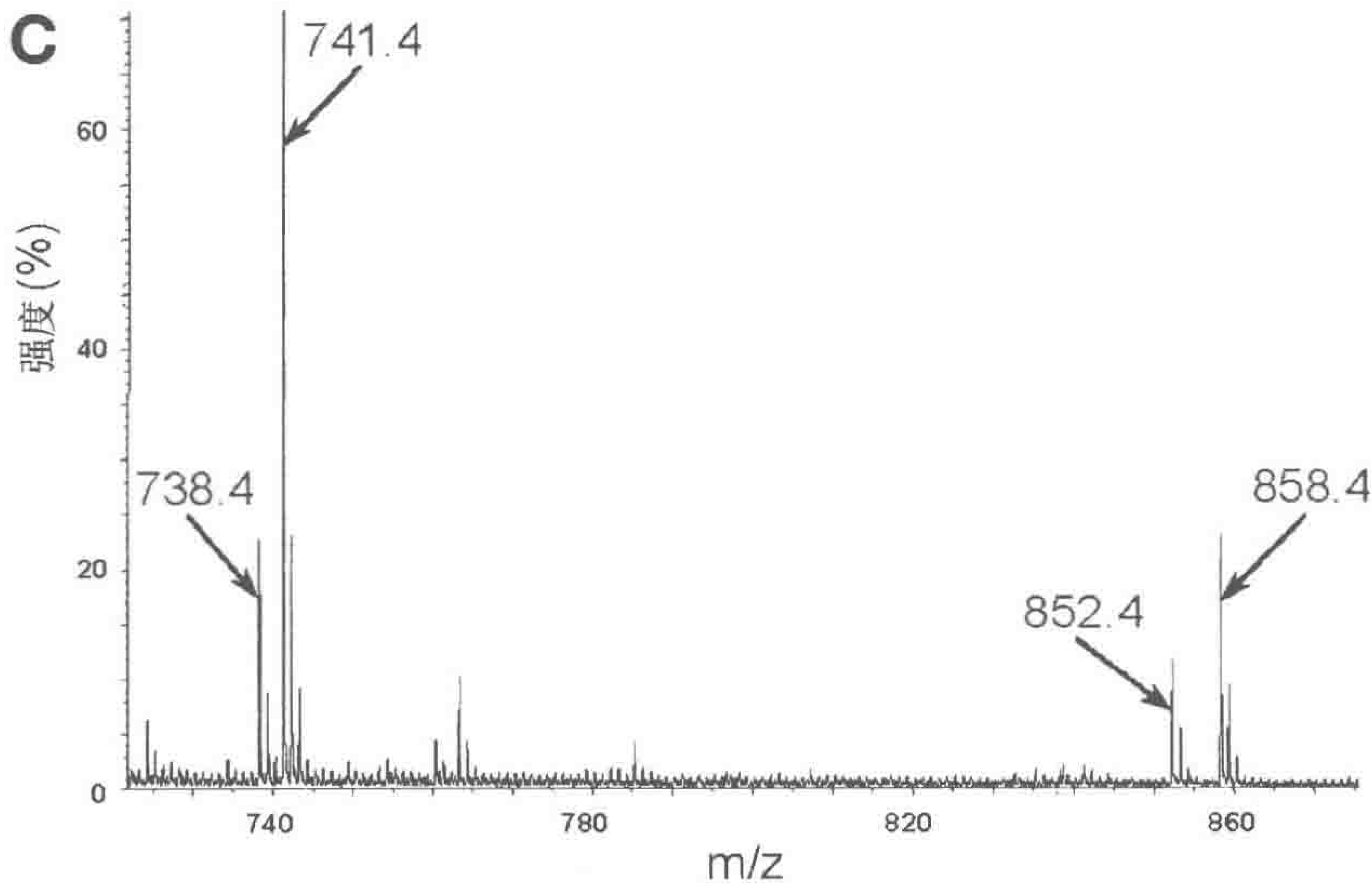


图 24-1　磷酸化肽的相对定量分析

A. 两个不同条件下生长的植物的相同蛋白质组分经胰蛋白酶酶解得到的磷酸肽富集及其稳定同位素标记的实验步骤（B 和 C）。按照上述的实验步骤处理的两种不同条件下生长的拟南芥的类囊体膜蛋白的胰蛋白酶酶解肽混合物的全扫描谱结果。B. 离子 738.4 和 741.4 分别代表 D2 蛋白 N 端的甲基化磷酸肽 *Ac*-tIALGK（*m*/*z*=724.4）的轻（条件 1）和重（条件 2）同位素标记物（小写字母 t 指肽序列的磷酸苏氨酸）。轻、重甲醇标记肽的总峰面积的比例为 3∶1，离子 852.4 和 858.4 分别代表源自于 D1 蛋白 N 端的轻（条件 1）和重（条件 2）同位素标记的磷酸肽 *Ac*-tAILER（*m*/*z*=824.4）。肽段内的 C 端和谷氨酸羧基基团在酯化过程（A）中被甲基化。轻、重标记的同位素比例为 2∶1。C. 频谱对应于两个不同条件的相同样品。不过，条件 1 和条件 2 相应的肽段在酯化过程中被同位素标记。*Ac*-tIALGK 和 *Ac*-tAILER 的轻、重同位素标记的比例分别为 1∶3 和 1∶2。

（3）混合样品 1 和样品 2，真空离心干燥。

（4）用 5μl 甲醇/水/乙腈（1∶1∶1，体积比）溶解干燥的肽样品，运行上述的 IMAC（见 24.3.2 节 2）。

为建立内标，需要添加一个额外的实验。在这个实验中，两个样品分别被以相反的形式标记，如样品 1 被轻同位素标记，则样品 2 就被重同位素标记。接着用重甲醇甲基化样品 1，用轻甲醇甲基化样品 2。与内标对比后，“直接”标记（图 24-1B）和“反向”标记（图 24-1C）的质谱图显示相同的磷酸化比例。

24.3.5　用 LC-MS 测定蛋白质的磷酸化比率

在为从膜中或可溶性（见 24.3.1 节 2）细胞组分中获得的肽混合物中的磷酸肽进行质谱分析后（见 24.3.1 节 1），每个初始位点的磷酸化的化学计量可通过 LC-MS 确定。该方法是基于测量在混合物[7]中磷酸化肽与非磷酸化肽的比例（见注释 10）。

（1）在这个实验中，取 20～40μl 经胰蛋白酶消化的总肽混合物（见 24.3.1 节 1 和 24.3.1 节 2）作为 LC-MS 分析的样品。用 5μm 的 C18 MetaChem 150mm×1.0mm 柱子以流速 20μl/min，分离肽样品组分。

(2) 用0.1%（V/V）的甲酸水溶液（A）和0.1%（V/V）的甲酸乙腈溶液（B），按如下时间段用于洗脱：0%B，0～3min；0～20%B，3～20min；20%～70%B，20～105min；70%～99%B，105～115min。

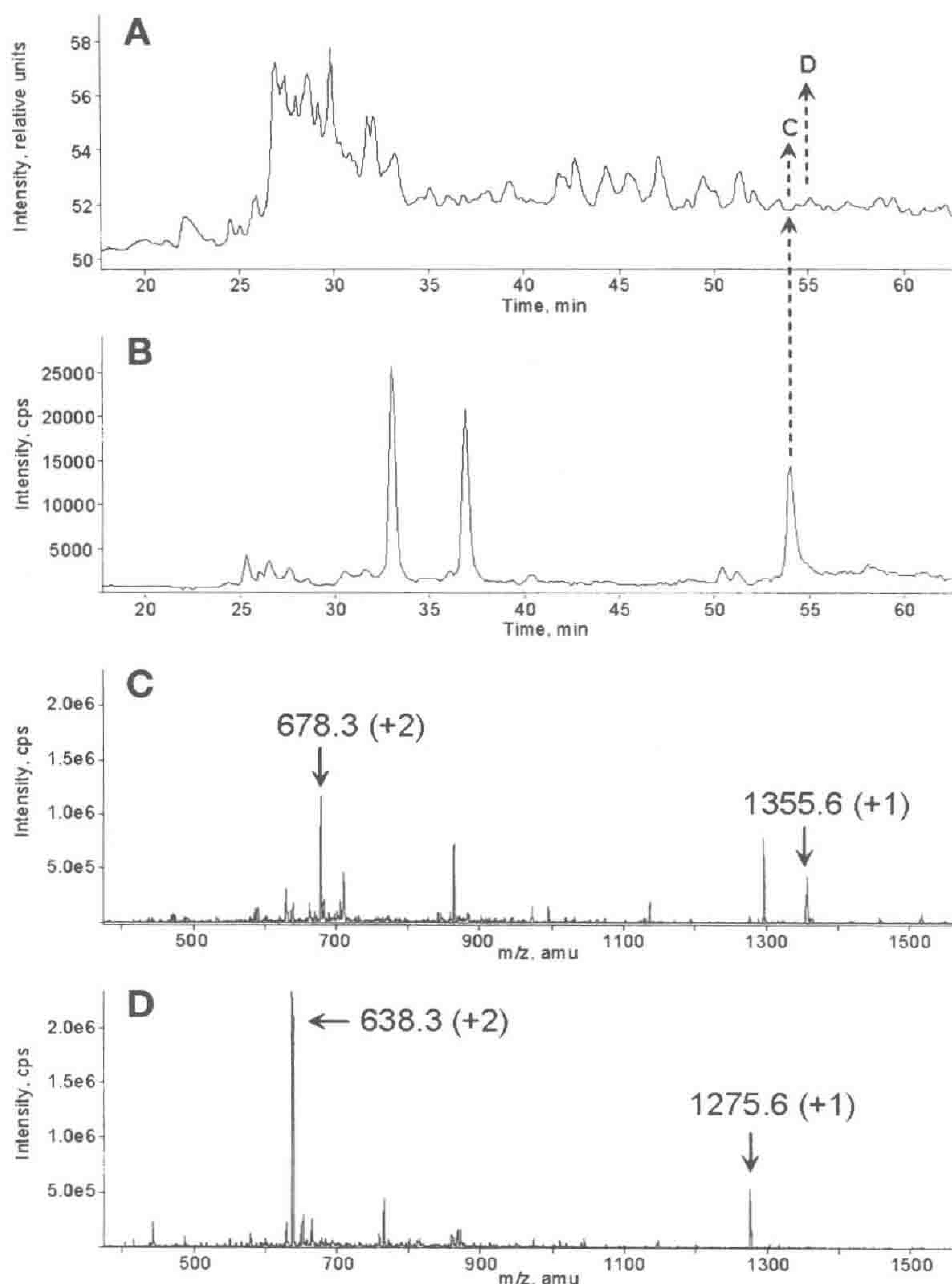


图 24-2 根据 Vener 等[7]的方法确定膜蛋白磷酸化水平

用胰蛋白酶消化从拟南芥类中分离出来的囊体膜（见 24.3.1 节 1）。从膜蛋白释放出来的肽样品既包含磷酸化及其相应的非磷酸化肽，其比率与体内每个位点的磷酸化修饰比率程度相当。这些肽样品用两个平行质谱实验的 LC-MS 检测：通过检测诊断肽离子（$m/z=-79$），可得到在正电离模式（A）和负电离模式（B）中，磷酸肽的洗脱时间。含有磷酸肽的组分在负电离实验（B）中有谱峰出现。相应组分的正电离谱（从 B 到 A 的虚线）用之前的磷酸化位点实验确定的已知分子质量的磷酸肽验证。例如，在（A）中标记“C”的组分在（C）中有波谱显示。波谱（C）中包含在谱图中的 m/z 值显示的单质子化和双质子蛋白磷酸肽的信号。检测磷酸肽组分以后的1～2min 洗脱下来的组分（在 A 中标记“D”）显示非磷酸化肽信号，正如（D）中的 m/z 值所示的单质子化和双质子化离子。每个磷酸肽的峰面积，以及相应的非磷酸化肽的峰面积可从 LC-MS 记录文件提取出来。磷酸肽与非磷酸化肽的比值表示肽的磷酸化程度（磷酸化修饰位点）

（3）用带标准离子喷雾源的三重四极杆质谱仪进行肽段在线检测。采用该设备推荐的设置。

（4）在整个 LC-MS 运行过程中连续进行两个平行的质谱分析：①在正电离模式下，获取所有的肽组分频谱；②在检测 $m/z=-79$ 的诊断磷离子的负电离模式下，检测含磷酸肽的组分（见注释 11）。

（5）两个平行实验的结果（图 24-2A 和 B）被存储为电计算机文档，如图 24-2 所示对它们进行分析。

（6）首先，要确定已知 m/z 的磷酸肽的洗脱收集点。

（7）然后确定那些与非磷酸化肽对应的洗脱峰信号。

（8）每个磷酸肽所有电离状态的峰值强度总和与相对应的非磷酸化肽段的所有电离状态的峰值强度总和的比值，反映了蛋白质的磷酸化程度。

（9）因为同时在同一样品中被检测到磷酸化肽和非磷酸化肽，因此来自膜或可溶性组分的样品中的具体蛋白质的磷酸化化学计量可被测量。

24.4　注　　释

（1）胰蛋白酶消化酶解的肽经 25mmol/L 碳铵（NH_4HCO_3）处理后，上清液可直接用于质谱分析。为了去除膜样品制备过程中所使用的缓冲液中多余的盐，用 25mmol/L NH_4HCO_3 对膜样品进行两次以上的洗涤。

（2）为了避免由蛋白磷酸酶引起的蛋白质去磷酸化，在 25mmol/L 碳酸氢铵洗脱液中添加 10mmol/L 氟化钠。同时，膜样品的清洗过程的悬浮和离心操作也应在 4℃下进行。

（3）甲酰甲基化可防止初级氧化造成的半胱氨酸残基的非正常修饰。

（4）提供含有高浓度的蛋白质（叶绿素）（10～15mg 蛋白质/ml，或 3mg 叶绿素/ml）膜悬浮物进行胰蛋白酶消化酶解并得到可直接用于质谱分析的一个高浓度的肽样品是非常重要的。

（5）要在 22～25℃，而不是在 37℃下进行光合膜蛋白酶解处理，因为许多光系统 II 磷酸化蛋白可在 37℃下被热休克蛋白激活的膜蛋白磷酸酶迅速去磷酸化。

（6）使用前新鲜配制三氯化铁溶液。

（7）不要在洗脱液中添加 TFA，因为 TFA 会在 ESI-MS 过程中抑制肽的电离。

（8）肽应被电离为带正电荷的质子离子。为增加阳性电离，可在分析之前加入最终浓度为 1%的甲酸对肽样品进行酸化处理。

（9）单电荷和多电荷离子峰都能够指示肽，ESI 中的化学噪声主要由单电荷离子峰组成。高信噪比的肽离子使它们在质谱谱图上易于识别。由于多电荷离子的同位素形式比单电荷离子同位素形式具有更高的密度，所以在该噪音水平上也能看到多电荷的钛离子。

(10) 肽的性质及其电离特性决定用质谱检测的肽离子强度。因此，定量比较不同的肽一般来说是不允许的。但是，由于肽的磷酸化仅增加了 80m/z（HPO_3），不改变酸性条件下肽的电离状态，因此，可以通过 LC-MS，在正电离模式条件下，定量分析一个磷酸肽和与其相对应的非磷酸化肽的比例。

(11) 两个平行的质谱实验按照以下设置进行：在 320～1800m/z 范围内，以阳性离子扫描模式扫描 5.2s，暂停 0.7s 进行极性转换；然后在阴离子模式下，单离子检测 79m/z 1.5s，接着再暂停 0.7s 返回到阳离子模式。在整个的 LC-MS 运行过程中不断重复这样的正/负离子扫描循环的。

致谢

这项工作获得了瑞典环境、农业和空间规划研究理事会（Formas）Nordiskt Kontaktorgan för Jordbruksforskning（NKJ）以及基因组学和生物信息学研究生院（FGB）的支持。

参 考 文 献

1. Michel, H. P. and Bennett, J. (1987) Identification of the phosphorylation site of an 8.3 kDa protein from photosystem II of spinach. *FEBS Lett.* **212,** 103–108.
2. Elich, T. D., Edelman, M., and Mattoo, A. K. (1992) Identification, characterization, and resolution of the in vivo phosphorylated form of the D1 photosystem II reaction center protein. *J. Biol. Chem.* **267,** 3523–3529.
3. Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U. M., Carlberg, I., Andersson, B., and Aro, E.-M. (1997) Phosphorylation of light-harvesting complex II and photosystem II core proteins shows different irradiance-dependent regulation in vivo. Application of phosphothreonine antibodies to analysis of thylakoid phosphoproteins. *J. Biol. Chem.* **272,** 30476–30482.
4. Rintamäki, E. and Aro, E.-M. (2001) Phosphorylation of photosystem II proteins, in *Regulation of Photosynthesis* (Aro, E.-M. and Andersson, B., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Nederlands, pp. 395–418.
5. Gomez, S. M., Nishio, J. N., Faull, K. F., and Whitelegge, J. P. (2002) The chloroplast grana proteome defined by intact mass measurements from liquid chromatography mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 46–59.
6. Carlberg, I., Hansson, M., Kieselbach, T., Schroder, W. P., Andersson, B., and Vener, A. V. (2003) A novel plant protein undergoing light-induced phosphorylation and release from the photosynthetic thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 757–762.
7. Vener, A. V., Harms, A., Sussman, M. R., and Vierstra, R. D. (2001) Mass spectrometric resolution of reversible protein phosphorylation in photosynthetic membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276,** 6959–6966.
8. Hansson, M. and Vener, A. V. (2003) Identification of three previously unknown in vivo protein phosphorylation sites in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **2,** 550–559.

9. Nuhse, T. S., Stensballe, A., Jensen, O. N., and Peck, S. C. (2003) Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2,** 1234–1243.
10. Aro, E.-M., Rokka, A., and Vener, A. V. (2004) Determination of phosphoproteins in higher plant thylakoids. *Methods Mol. Biol.* **274,** 271–285.
11. Loyet, K. M., Stults, J. T., and Arnott, D. (2005) Mass spectrometric contributions to the practice of phosphorylation site mapping through 2003: a literature review. *Mol. Cell. Proteomics* **4,** 235–245.
12. Ficarro, S. B., McCleland, M. L., Stukenberg, P. T., et al. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* **20,** 301–305.
13. Shou, W., Verma, R., Annan, R. S., et al. (2002) Mapping phosphorylation sites in proteins by mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **351,** 279–296.
14. He, T., Alving, K., Field, B., et al. (2004) Quantitation of phosphopeptides using affinity chromatography and stable isotope labeling. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15,** 363–373.
15. Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V. A., et al. (2003) Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J. Biol. Chem.* **278,** 11,579–11,589.
16. Rokka, A., Aro, E.-M., Herrmann, R. G., Andersson, B., and Vener, A. V. (2000) Dephosphorylation of photosystem II reaction center proteins in plant photosynthetic membranes as an immediate response to abrupt elevation of temperature. *Plant Physiol.* **123,** 1525–1536.

第25章 植物蛋白质组学和糖基化

Anne-Catherine Fitchette，Olivia Tran Dinh，Loïc Faye，Muriel Bardor

摘要 像其他真核细胞一样，在植物细胞中，糖基化是被研究最多的翻译后事件之一。根据寡糖部分和蛋白质骨架之间的连接方式，可将糖基化分为两种类型：*N*-糖基化和*O*-糖基化。在此介绍我们实验室常用的研究植物蛋白质糖基化的几种不同的实验方法。这些方法依赖于糖特异探针的印记检测、糖蛋白的特异去糖基化以及质谱分析。通过这些实验，不仅可以确定一个蛋白质是不是糖蛋白，还可以确定糖蛋白是在哪个位置以及如何被糖基化的。本章最后部分介绍植物细胞中糖蛋白类群的特殊纯化和鉴定方法，称为糖蛋白质组学。

关键词 *N*-糖基化；*O*-糖基化；*N*-*O*-乙酰葡糖胺；植物凝集素；抗糖抗体；*β*-消除反应；内糖苷酶 H；肽-*N*-糖苷酶 F；肽-*N*-糖苷酶 A；糖蛋白质组学；MALDI-TOF；LC-MS/MS

25.1 前　　言

与其他真核细胞一样，植物细胞中，糖基化通常发生在分泌蛋白质上，虽然在细胞质蛋白和核蛋白上也发现一些糖基化反应。根据寡糖部分和蛋白质骨架之间的连接方式，可将糖基化分为两种类型：*N*-糖基化和*O*-糖基化。植物中*N*-糖基化研究最多。

25.1.1 *N*-糖基化

与其他真核细胞一样，在植物细胞中，*N*-糖基化只发生在进入分泌途径的蛋白质上。它从内质网中的寡聚糖前体 $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 共翻译转移到构成初生蛋白质（Asn-X-Ser/Thr，X 可以是除脯氨酸和天冬氨酸以外的任意一种氨基酸）*N*-糖基化序列的特异天冬酰胺残基上开始，当新合成的蛋白质进入内质网腔后就发生 *N* 端序列糖基化反应（图 25-1B）[1]。接着，当糖蛋白从内质网经高尔基体到达其最终目的地时，$Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 前体沿着分泌途径进行进一步加工处理。如果糖基侧链能被内质网和高尔基体中的糖苷酶和糖基转移酶加工的话，$Glc_3Man_9GlcNAc_2$ 前体就会被成功转化为 $Man_9GlcNAc_2$ 和 $Man_5GlcNAc_2$ 范围内的高甘露糖型 *N*-聚糖（图 25-1A），以及复杂形式的 *N*-聚糖。植物复杂形式 *N*-糖苷有一个挂在中心的近端氨基葡糖上的 *α*-1-3 岩藻糖；一个与中心 *β*-甘露糖连接的 *β*-1-2 木糖残基，和/或与它们的末端天线（称为 Lewisa）连接的 Gal*β*-1-3（Fuc*α*-1-4）GlcNAc 寡聚糖末端序列，称为 Lewisa（图 25-1B）[1]。

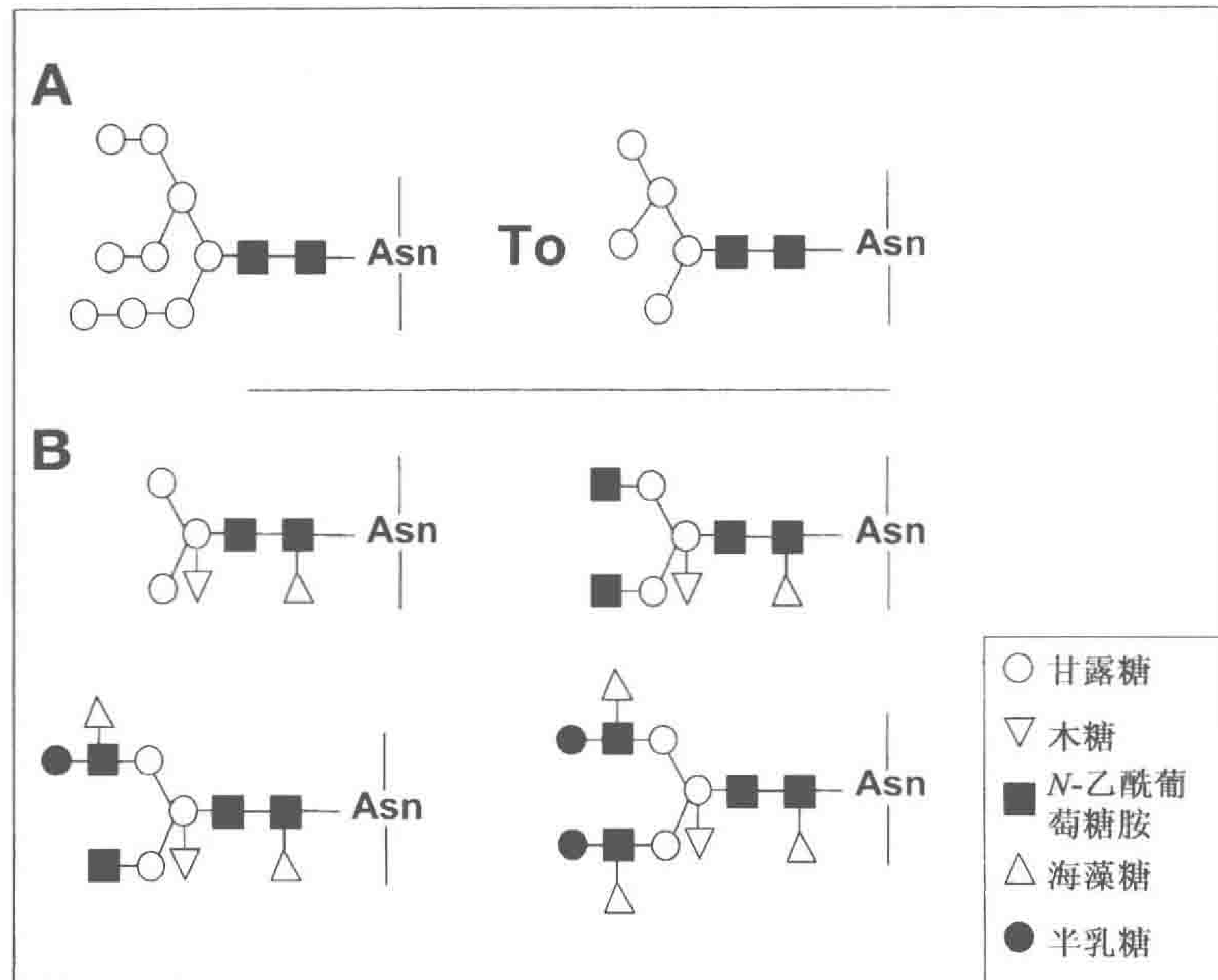


图 25-1　植物中 N-连接寡糖的结构

高甘露糖型 N-糖链是由被 2～6 个甘露糖残基所替换的 $Man_3GlcNAc_2$ 中心组成的（A）。复杂形式的 N-糖苷中，有一个 β-1-2 木糖和（或）与中心相连的 α-1-3 岩藻糖。有些还带有含单个 GlcNAc 或一个 Gal β-1-3（Fucα-1-4）GlcNAc Lewisa 的三糖终端天线（B）

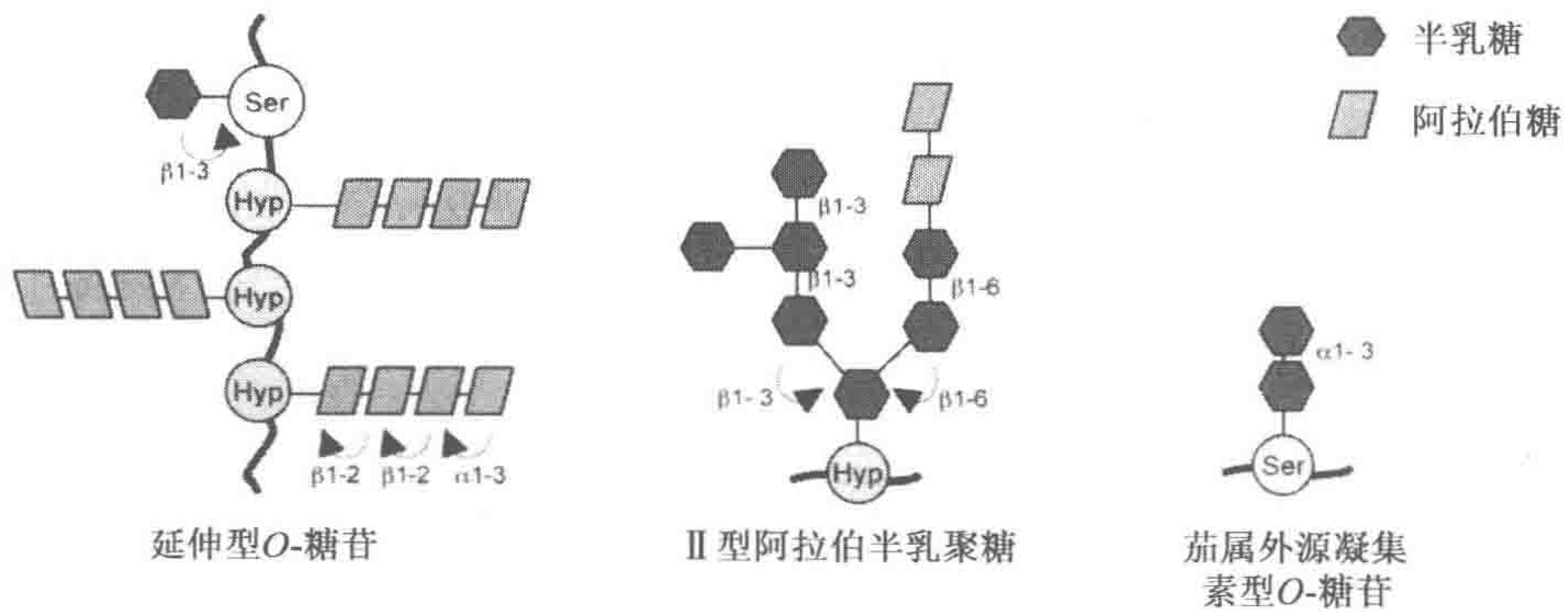


图 25-2　与植物糖蛋白连接的 O-糖苷的结构（摘自参考文献 4）

25.1.2　O-糖基化

在植物细胞中 O-糖基化可分为两种类型。即分泌蛋白糖基化或细胞质/核蛋白糖基化。蛋白质上不同位点的 O-连聚糖的性质不同。

1. 分泌蛋白质的 *O*-糖基化

对植物分泌蛋白的 *O*-糖基化的了解还很少。只有少数几篇文章报道了与植物糖蛋白上的一些丝氨酸或苏氨酸残基连接的 *O*-聚糖。一些糖蛋白，如细胞壁伸展蛋白和液泡中的甘薯贮藏蛋白（sporamin）都被认为是一类含有一个单半乳糖 *O*-糖基化的丝氨酸残基的糖蛋白[2,3]。分析鉴定水稻被转运到液泡的谷蛋白也是为了证明哺乳动物黏蛋白型糖基化的存在，植物中这一类型 *O*-糖基化依然存在争议[4]。第二种类型的分泌蛋白 *O*-糖基化要求糖蛋白脯氨酸残基的羟基化，我们已发现植物中的富含羟脯氨酸的糖蛋白（HRGP）。HRGP 是植物中主要表面糖蛋白。这些定位于细胞壁或细胞质膜外表面的 HRGP，有三类蛋白质：伸展蛋白，阿拉伯半乳糖链蛋白（AGP）和茄科凝集素（图 25-2）。伸展蛋白和茄科凝集素含有由丝氨酸-(羟脯氨酸)$_4$ 组成的重复序列，这里的丝氨酸可被 *O*-糖基化，而羟脯氨酸可被阿拉伯糖链取代[5]。这个阿拉伯糖化过程在高尔基体中发生[6]。AGP 家族是那些高糖基化的胞外蛋白和细胞质膜蛋白质。其蛋白质部分富含羟脯氨酸（Hyp）、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸和甘氨酸，并含有 Ala-Hyp 重复序列。脯氨酰-4-羟化酶的催化作用可将内质网和/或高尔基体中脯氨酸转换成羟脯氨酸[4,7]。AGP 的 *O*-糖基化过程是一种添加了被 β-1-6 半乳糖支链取代 β-1-3 半乳糖数组成的寡聚糖支链的羟脯氨酸后的循序渐进的方式，β-1-6 半乳糖支链反过来由阿拉伯糖或者其他的低丰度的单糖依次形成分支（图 25-2）[8]。

2. *O*-GlcNAc 糖基化修饰

另外一种在哺乳动物中得到详细阐述的 *O*-糖基化形式是细胞质和细胞核蛋白的 *O*-GlcNAc 糖基化。这种在蛋白质上添加 *O*-GlcNAc 的修饰，在真核生物中非常普遍，发生在丝氨酸或苏氨酸的 β-连接上。尽管序列 Tyr-Ser-Pro-Thr*-Ser-Pro-Ser*（标有 * 是发生糖基化的氨基酸）代表一类典型的 GlcNAc 连接位点[9]，但是对可被 *O*-GlcNAc 糖基化的保守序列还不十分清楚。*O*-GlcNAc 糖基化是一种高度动态过程，而且通常与 *O*-磷酸化修饰交互进行[10]。在 *O*-GlcNAc 糖基转移酶的催化作用下，糖基被添加到蛋白质上，而在 *O*-GlcNAc 糖苷酶的催化作用下，糖基被从蛋白质上移除[10]。许多细胞活动过程，如蛋白转运入细胞核、转录、细胞骨架附着在细胞膜上或蛋白合成等都参与了这个糖基化修饰，目前对它的确切作用还了解不多。

植物中有关 *O*-GlcNAc 糖基化的报道还很少，与 *O*-GlcNAc 转移酶相似的两个被命名为 SPINDLY 和 SEC 的酶已在拟南芥中克隆出来[11~13]。它们在离体条件下具有 *O*-GlcNAc 转移酶活性，但还不清楚它们在植物体内的天然底物。此外，有报道将一些细胞核蛋白描述为携带末端为 GlcNAc 的 *O*-连聚糖的糖蛋白[14,15]。这些细胞核蛋白是否为 SPINDLY 和 SEC 的底物仍是个谜。

25.1.3 糖基化的异质性

真核细胞的成熟分泌糖蛋白 *N*-糖基化模式是内质网中的寡聚糖共翻译转运过程和其在内质网和高尔基体内加工的共同结果。多肽折叠因子会影响内质网内潜在糖基化位

点[16]。结果导致蛋白质中的多个 N-糖基化位点中有些位点为无效糖基化位点，其他一些则未能完全糖基化[17-19]。

同时，多糖侧链的修饰加工与其是否接触到成熟的酶相关。虽然被包被在蛋白分子结构内部的寡糖仍然是未修饰的高甘露糖型 N-糖链，但位于蛋白质表面的糖苷将成熟转变为复杂形式的 N-糖苷[17]。这种现象也同样发生在 O-糖苷上。因此，要鉴定植物糖蛋白的糖基化，不仅需要鉴定糖-蛋白连接及附着在糖蛋白上的寡聚糖的结构，而且还要确定其在蛋白分子骨架上的潜在糖基化位点的分布/定位。

本章的目的是向植物蛋白质组学工作者介绍一些工具和方法，用于确定所鉴定的蛋白是否为糖蛋白，类别以及蛋白骨架上糖苷侧链的位置。本章的最后部分将论述植物糖蛋白质组学中的糖蛋白鉴定方法。

25.2　材　　料

25.2.1　这个蛋白是糖蛋白吗

DIG 糖链检测试剂盒（Roche Applied Science，Mannheim，Germany）（保存于2～8℃）

25.2.2　我的蛋白是怎样被糖基化的

1. 应用 Western 印记杂交检测糖苷

1）凝集素亲和检测方法

（1）TTBS 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH7.4，含 0.5mol/L NaCl 和 0.1% Tween-20。

（2）Lectin-biotin：GNA（雪花莲凝集素）-生物素（Vector Labs/Abcys，France）（保存于 2～8℃）和 WGA（麦胚凝集素）-生物素（Sigma Aldrich，Lyon，France）（保存于 2～8℃）。

（3）链霉亲和素-过氧化物酶（Amersham Biosciences/GE，Healthcare，Uppsala，Sweden）（保存于 2～8℃）。

（4）TBS 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl。

（5）4-氯-1-萘酚（Bio-Rad，Hercules，CA）（保存于−20℃）。

（6）牛胰核糖核酸酶 B（Sigma Aldrich）（保存于 2～8℃）。

（7）甲基-α-D-吡喃甘露糖苷（Sigma Aldrich）（室温保存）。

（8）牛晶状体 α-A-晶体蛋白（Sigma Aldrich）（保存于−70℃）。

（9）卵清白蛋白（Sigma Aldrich）（保存于 2～8℃）。

（10）TTBS* 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl，1mmol/L $CaCl_2$；1mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1%Tween-20。

（11）刀豆球蛋白 A（Sigma Aldrich）（保存于 5～8℃）。

（12）辣根过氧化物酶（HRP；Sigma Aldrich）（保存于 2～8℃）。

(13) 大豆凝集素(Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

2) 特异抗体免疫检测方法

(1) TBS 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl。

(2) 明胶(Bio-Rad)。

(3) 抗 HRP 免疫兔血清(Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

(4) 抗蜂毒抗体(蜂毒，Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

(5) 鼠抗人 Lewisa 单克隆抗体(Calbiochem，Meudon，France)(保存于－20℃)。

(6) TTBS 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH7.4，含 0.5mol/L NaCl 和 0.1% Tween-20。

(7) 羊抗鼠免疫球蛋白辣根过氧化酶标记抗体(Sigma Aldrich)(保存于－20℃)。

(8) 羊抗兔免疫球蛋白辣根过氧化酶标记抗体(Bio-Rad)(保存于 2～8℃)。

(9) 来源于蜂毒的磷脂酶 A2(Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

(10) 菜豆凝集素(PHA-L；Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

(11) 玉米中表达的重组抗生物素蛋白(Sigma Aldrich)(保存于 2～8℃)。

2. 糖苷的单糖组分分析

(1) 2mL 带聚四氟乙烯涂层的螺旋盖子的瓶子(Interchim，Montluçon，France)。

(2) 2mmol/L 肌醇水溶液(保存于 4℃)。

(3) 甲醇-HCl 3mol/L 试剂盒(Supelco，Bellefonte，PA)(保存于 2～8℃)，打开一瓶，用甲醇稀释到 1mol/L 甲醇-HCl 的浓度(见注释 1)。

(4) 无水乙酸 98%，分析纯级试剂(Sigma Aldrich，Aldrich)(室温保存)。

(5) 吡啶，99.8%无水(Sigma Aldrich)(室温保存)。

(6) 硅烷化试剂：六甲基二硅烷＋三甲基氯硅烷＋吡啶，3∶1∶9(Sylon HTP)试剂盒(Supelco)(保存于 2～8℃；见注释 1)。

(7) 环已烷 Rectapur(VWR，Fontenay sous Bois，France)(室温保存)。

(8) 配有 CP-SIL 5 CB 硅胶柱(25m×0.25mm)的气相色谱分析设备。

3. 糖苷释放后的蛋白质分析

1) 糖苷释放的化学处理方法

(1) 配有聚四氟乙烯涂层螺帽的玻璃反应管(Pyrex 组培管)(Bibby Sterilin Stone，Staffs，England)。

(2) 硼氢化钠溶液：在 100mmol/L NaOH 溶液中，新鲜配制浓度为 40mg/ml 的硼氢化钠溶液。

(3) 98%无水乙酸，分析纯级试剂(Sigma Aldrich，Aldrich)(室温保存)。

2) *N*-或 *O*-糖苷酶酶促方法

(1) 1%十二烷基磺酸钠溶液(SDS)。

(2) 150mmol/L 乙酸钠缓冲液，pH 5.7。

(3) 内切糖苷酶 H：来源于灰色链霉菌的内切糖苷酶 H，经大肠杆菌重组(Roche

Applied Science）（保存在 2～8℃，冰冻会使酶失活）。

（4）0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5，含 0.1% SDS。

（5）0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.5，含 0.5% Nonidet P40。

（6）Nonidet P40（现称为 IGEPAL；Sigma Aldrich）。

（7）*N*-糖酰胺酶 F：来源于脑膜脓毒性黄杆菌的 *N*-糖酰胺酶 F。（Roche Applied Science）（保存于－25～－15℃）。

（8）10mmol/L HCl 溶液，pH 2.2。

（9）C18 色谱柱：Bond Elut C18 色谱柱（Varian，Palo Alto，CA）（室温保存）。

（10）乙腈，纯度 99.5%以上（Sigma Aldrich）。

（11）100mmol/L 乙酸钠缓冲液，pH 5.5。

（12）来源于猪胃黏膜的胃蛋白酶 A（Sigma Aldrich）。

（13）*N*-糖酰胺酶 A：来源于甜杏仁油的 *N*-糖酰胺酶 A（Roche Applied Science）（保存于－25～－15℃）。

（14）去糖基化酶试剂盒（Prozyme，San Leandro，CA）（保存于 4℃）。

25.2.3　被糖基化的蛋白在哪里

（1）50mmol/L 碳酸氢铵，pH 8.0。

（2）胰蛋白酶：来源于牛胰腺的经 TPCK 处理的胰蛋白酶（Sigma Aldrich，Fluka 产品）（保存于－20℃）。

（3）胰凝乳蛋白酶：来源于牛胰腺的经 TLCK 处理的胰凝乳蛋白酶（Sigma Aldrich）（保存于－20℃）。

（4）C18 色谱柱：Merck C18 Spherisorb ODS 2 色谱柱（5μm，4.6mm×250mm，VWR）。

（5）溶液 A：90∶10 水/乙腈含 0.1%三氟乙酸（TFA）。

（6）溶液 B：10∶90 水/乙腈含 0.1%三氟乙酸（TFA）。

25.2.4　怎样对全糖蛋白质组进行分析

1. 含高甘露糖 *N*-糖苷糖蛋白的鉴定

（1）TBS 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl。

（2）Bradford 蛋白质定量测定试剂：Bio-Rad 蛋白质定量测定试剂（保存于 4℃）。

（3）0.20μm 针头过滤器：Filtropur S 0.2（Sarstedt，Nümbrecht，Germany）。

（4）刀豆蛋白 A-琼脂糖凝胶：Con A Sepharose™ 4B（Amersham Biosciences）（保存于 4℃）。

（5）TBS*：20mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl，1mmol/L $CaCl_2$ 和 1mmol/L $MgCl_2$。

（6）Poly-Prep®离子交换柱（Bio-Rad）。

（7）TTBS*：20mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.4，含 0.5mol/L NaCl，1mmol/L

$CaCl_2$，1mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1% Tween-20。

(8) 甲基-α-D-吡喃甘露糖苷（Sigma Aldrich）（室温保存）。

2. *O*-GlcNAc 糖基化糖蛋白的鉴定

(1) 神奇滤布（Calbiochem，Meudon，France）。

(2) WGA 缓冲液：20mmol/L Tris-HCl，pH 7.8，含 150mmol/L KCl，2mmol/L $CaCl_2$，10mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L 二硫苏糖（DTT）和蛋白酶抑制剂。

(3) 鸡尾酒蛋白酶抑制剂（Roche Applied Science）（保存于 4℃）。

(4) Amicon Bioseparation YM-10 离心超滤管（Millipore，Saint Quentin en Yvelines，France）。

(5) Nonidet P40（Sigma Aldrich）。

(6) *N*-糖酰胺酶 F：来源于脑膜脓毒性黄杆菌的 *N*-糖酰胺酶 F（Roche Applied Science）（保存于－25～－15℃）。

(7) 麦胚凝集素-琼脂糖（Sigma Aldrich）（保存于 2～8℃）。

(8) *N*-乙酰葡糖胺（Sigma Aldrich）。

25.3　方　　法

25.3.1　这个蛋白质是糖蛋白吗

只有一种方法能全面的回答“这个蛋白质是糖蛋白吗?”这个问题。这需要使用能检测并定量印记上糖蛋白的总糖检测试剂盒。Roche Applied Science 公司商业出品——DIG 聚糖检测试剂盒（产品包含使用说明）提供了这些测定所需的试剂。需要指出的是，在使用这个试剂盒时，蛋白质至少结合有一个糖苷部分才能获得实验结果，这些检测无法提供参与糖基化的寡聚糖分子的类型和其与蛋白骨架连接的相关信息。

25.3.2　蛋白质是怎样被糖基化的

有几种方法可以用来进行糖蛋白上糖苷特性的鉴定，一种方法包括应用糖蛋白寡糖部分的特异性探针的 Western 印迹实验，这种探针有凝集素型和抗体型两种类型。这个方法既不需要进行糖蛋白样品的纯化，也不需要糖苷的解离或分离（见 25.3.2 节 1.1）。另一种方法是分离糖蛋白，直接分析与糖蛋白连接的糖苷的单糖组成（见 25.3.2 节 2.1）。还有一种方法是经化学或酶学处理，将纯化获得的糖蛋白上的糖苷选择性解离下来。接着通过电泳或质谱对去糖基化之前或之后的糖蛋白进行分析（见 25.3.2 节 2.1）。选择性裂解会为我们带来与糖蛋白连接的糖苷的特性。与此同时，通过质谱鉴定到的蛋白分子质量的差异将为我们提供与糖蛋白连接的糖苷的结构信息。

1. Western 印迹检测糖苷的方法

一维或二维电泳胶的 Western 印迹可用来检测糖蛋白上糖苷。用于这种检测的探针大多具有 *N*-连糖苷特异性。

1）凝集素亲和检测

凝集素是一类可与寡聚糖部分特异结合的植物蛋白质，它们已被鉴定出具有对哺乳动物糖蛋白的亲和性，这些凝集素列于表 25-1 中，其中只有一少部分可用于植物糖蛋白的检测（见注释 2）。

这类凝集素商品是凝集素-生物素化形式。通过链霉亲和素-辣根过氧化物酶标识物，辨别凝集素和寡糖。但是，唯有刀豆球蛋白 A 例外，因为它可直接结合到过氧化物酶上。下面是这两种方案的具体内容：

凝集素-生物素/链霉亲和素-过氧化物酶方法：

（1）通过 1D 或 2D 电泳分离，并转移到硝酸纤维素膜上。

（2）用 TTBS 缓冲液浸泡印迹膜 1h（见注释 3）。

（3）将印迹膜在含有凝集素-生物素复合物（0.1mg/20ml）的 TTBS 缓冲液中，室温下浸泡 2h。

（4）在 TTBS 缓冲液中漂洗 4 次，每次 15min。

（5）将印迹膜在以 1∶1000 稀释在 TTBS 缓冲液中的链霉亲和素-辣根过氧化物酶标识物中，室温下温育 1h。

（6）在 TTBS 缓冲液中漂洗印迹膜 4 次（每次 15min），显影前在 TBS 溶液中漂洗一次。

（7）在一个烧杯中将 30mg 4-氯-1-萘酚溶解在 10ml 冷甲醇中（−20℃），在另一个烧杯中的 50ml TBS 缓冲液中加入 30μl H_2O_2。在要显影印迹膜时，合并上面这两个烧杯中的溶液，配制成过氧化物酶显影混合液（要现用现配），轻轻摇动来优化显影反应。

（8）倒掉显影混合液，并用蒸馏水漂洗印迹膜数遍，终止显影反应。晾干印迹膜，夹在两层滤纸之间保存。

（9）实验对照，请见注释 4。

刀豆球蛋白 A（ConA)-过氧化物酶方法（根据参考文献 20 修改的方法）。

（1）通过 1D 或 2D 电泳分离，并转移到硝酸纤维素膜上。

（2）用 TTBS 缓冲液浸泡印迹膜 1h。

（3）将印迹膜在含有 ConA（25μg/ml）的 TTBS* 缓冲液中，室温下温育 2h。

（4）在 TTBS 缓冲液中漂洗 4 次，每次 15min。

（5）将膜放置在含辣根过氧化物酶（HRP，50μg/mL）的 TTBS 缓冲液中，室温下温育 1h。

（6）在 TTBS 缓冲液中漂洗印迹膜 4 次（每次 15min），显影前在 TBS 溶液中漂洗一次。

（7）过氧化物酶的显影作用与凝集素-生物素/链霉亲和素-辣根过氧化物酶方法中的相同。

（8）实验必须设对照，见注释 4。

2）特异性抗体的免疫检测方法

我们已经报道了植物 *N*-复合糖苷的 β-1-2 木糖和 α-1-3 岩藻糖抗原表位在兔子血清中具有高免疫[21]。因此，含复合糖苷的糖蛋白抗血清往往含有抗 β-1-2 戊醛糖和 α-1-3 海藻糖的抗体。一些商业免疫血清与我们自制的探针具有相同的特性。如抗 HRP 的免疫血

表 25-1　用于植物细胞提取物 *N*-和 *O*-糖苷的 Western 印迹检测的凝集素

植物凝集素	特异性	植物中检测出的低聚糖	建议的阳性对照	糖抑制物	参考文献
刀豆球蛋白	αD：甘露糖 αD：葡萄糖	初期结构 M9G3～M9G1 高甘露糖结构 M9～M5	大豆凝集素 卵清蛋白 核糖核酸酶 B	甲基 α-D-甘露糖苷	*20*
雪莲凝集素（GNA）	末端 α1-3 甘露糖	高甘露糖结构 M8～M5	核糖核酸酶 B	甲基 α-D-甘露糖苷	*42，43*
麦芽凝集素（WGA）	末端 GlcNAc 内部壳二糖单元	末端 GlcNAc 的所有 *N*-连接 和 *O*-连接糖苷	牛眼透镜中的 α-A-结晶 （O-GlcNAc） 卵清蛋白（*N*-糖苷）	GlcNAc 壳三糖 壳二糖	*44*

清可用作植物含有 α-1-3 岩藻糖和 β-1-2 木糖残基的复合 N-糖苷的特异性探针。从蜂毒蛋白中获得的免疫血清具有更强的特异性，可用作含 α-1-3 岩藻糖的植物复合糖苷的特异性探针[21]。我们在实验室，从兔血清中获得了对复合型糖苷末端天线（三糖 Lewisa）的特异性兔抗体[22]。抗 Lewis a 的单克隆抗体已商业化，但其非常昂贵。

阿拉伯半乳糖蛋白（AGP）和伸展蛋白可用商业单克隆抗体检测（http://www.plantprobes.co.uk/）。我们实验室没有使用过这些抗体，请参考描述这些抗体特异性的原始论文（见注释 5）。

（1）通过 1D 或 2D 电泳分离，并转移到硝酸纤维素膜上。

（2）用含 3%明胶的 TBS 缓冲液，室温下浸泡印迹膜 1h。

（3）用含 1%明胶和适宜稀释浓度的免疫血清的 TBS 缓冲液，室温下浸泡印迹膜 2h。我们使用的 25.2.2 节 1.2）中提到的商业免疫血清，稀释方法如下：

a. 兔抗 HRP 免疫血清，1∶300。

b. 兔抗蜂毒蛋白免疫血清，1∶200。

c. 鼠抗 Lewis 单克隆抗体，1∶100。

（4）在 TTBS 缓冲液中漂洗 4 次，每次 15min。

（5）用含 1%明胶和适当的标记抗体的 TBS 缓冲液，室温下浸泡印迹膜 1h。标记抗体可为 1∶2000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG（G 型免疫球蛋白）抗体，或 1∶500 稀释的 HRP 标记羊抗鼠多价免疫球蛋白抗体。

（6）在 TTBS 缓冲液中漂洗印迹膜 4 次（每次 15min），显影前在 TBS 溶液中漂洗一次。

（7）过氧化物酶的显影作用与凝集素-生物素/辣根过氧化物酶方法中的相同（见 25.3.2 节 1.1））。

（8）对照见注释 6 和注释 7。

2. 糖苷单糖组分的分析

糖苷单糖组分的分析是通过用甲醇-HCl 溶液水解糖蛋白，然后用气相色谱鉴定和分析单糖产物及其衍生物。单糖组分分析结果提供了连接到糖蛋白（O-和/或 N-连寡聚糖）上的糖苷类型的初步数据。

（1）将 1mg 纯化的蛋白质样品放入带聚四氟乙烯涂层的螺旋盖子的玻璃管中，进行冻干处理（见注释 8）。

（2）向待测蛋白质样品中加入 5～10μL 的 2mmol/L 肌醇贮藏液（见注释 9）。甲醇分解反应之前再次冻干处理样品。

（3）在蛋白样品中加入 500μl 浓度为 1mol/L 甲醇-HCl 溶液，旋紧盖子，置于 80℃加热过夜。

（4）甲醇分解反应后的样品在氮气保护下，40℃加热干燥处理样品。注意：因甲醇有毒，应在通风橱中操作。

（5）用 250μl 甲醇漂洗，如步骤（4）的操作，在氮气环境下干燥处理样品，重复漂洗步骤两次。

（6）用 250μl 甲醇重悬样品，接着加入 25μl 的乙酸，25μl 吡啶，匀浆，在室温下放置 6h，如步骤（4）的操作，在氮气环境下干燥处理样品。

（7）加入 250μl 的硅烷化试剂，80℃温育 20min（见注释 1），空气吹干样品。

（8）用 1ml 环己烷冲洗，空气吹干，并重悬于 200μl 环己烷中，匀浆，离心，将 100μl 衍生物样品转移到带盖的反应小瓶中。

（9）设置气相色谱仪的氦气压强设为 1.4bar，注入样品前要将注射器和 FID 检测器分别加热到 250℃和 280℃。设置氦气的压力为 20psi，流速为 3ml/min。在注入 5μl 的衍生物样品（相当于 25μg 蛋白质）之前，平衡色谱柱的温度到 120℃。温度梯度洗脱单糖衍生物：①每分钟升高 10～160℃。②每分钟升高 1.5～235℃。③235℃ 4min。④每分钟升高 20～280℃。⑤280℃ 3min。

3. 糖基释放后的蛋白质分析

1）糖基释放的化学处理方法

还原性氨化反可应选择性的解离糖蛋白上的 *O*-糖苷（见注释 10）。去糖基化的蛋白用 1D SDS-PAGE 分析，将其迁移情况与其糖基化形式的蛋白进行比较，电泳迁移率的增加是 *O*-连糖苷出现在蛋白上的证据（见注释 11）。

（1）将 1mg 纯化的蛋白样品放入带聚四氟乙烯涂层的螺旋盖子的玻璃管中，进行冻干处理。

（2）将干燥样品溶解于 500μl 硼氢化钠溶液中，盖紧玻璃管，37℃过夜放置。

（3）逐滴添加乙酸来终止还原性氨化反应，直至无气体产生。再加入 500μl 的 10% 乙酸甲醇溶液。在通风橱内风干。重复洗涤过程 3 次以洗去剩余的硼酸盐。

（4）去糖基化处理后，去糖基化蛋白用 4 倍体积的乙醇于－20℃过夜沉淀处理，用合适的缓冲液溶解沉淀物用于 1D SDS-PAGE。同时可回收乙醇相中的糖苷，用于单糖组分分析（见 25.3.2 节 2）。

2）*N*-或 *O*-糖苷酶的酶促处理

用糖苷酶处理纯化获得的糖蛋白可得到进一步的信息。内切糖苷酶 H（Endo H）只能通过水解 *N*-糖苷中心的两个 GlcNAc 残基之间的糖苷键，来解离植物糖蛋白中的高甘露糖型的 *N*-糖苷（图 25-3）。多肽 *N*-糖苷酶（PNGase）通过水解位于肽链骨架天冬酰胺和寡聚糖近端 GlcNAc 之间的键，解离高甘露糖 *N*-糖苷和复合 *N*-糖苷。PNGase F，一种被广泛应用于哺乳动物糖蛋白分析的 *N*-糖苷酶，可解离高甘露糖 *N*-糖苷和复合 *N*-糖苷，但不能水解与邻近 GlcNAc 连接的 α-1-3 岩藻糖残基。PNGase A 可解离所有类型的植物 *N*-糖苷（图 25-3），但它几乎只对糖肽起作用，所以需要在去糖基化之前酶解糖蛋白[23,24]。糖蛋白或肽的去糖基化分析方法有：①电泳迁移的增加；②Endo H 或 PNGase F 处理后，糖蛋白对糖苷特异性探针免疫活性的丧失；③Endo H、PNGase F 或 PNGase A 处理后的质谱分析。对于 *O*-糖苷酶可以采用同样的手段和方法，但是我们实验室很少用，因此不在此详述（详情见参考文献 25 和 26）。

内切糖苷酶 H 去糖基化。

（1）在用 Endo H 去糖基化酶促处理之前，将纯化获得的蛋白质在 1% SDS（*m*/*V*）存在下，100℃加热变性处理 5min。

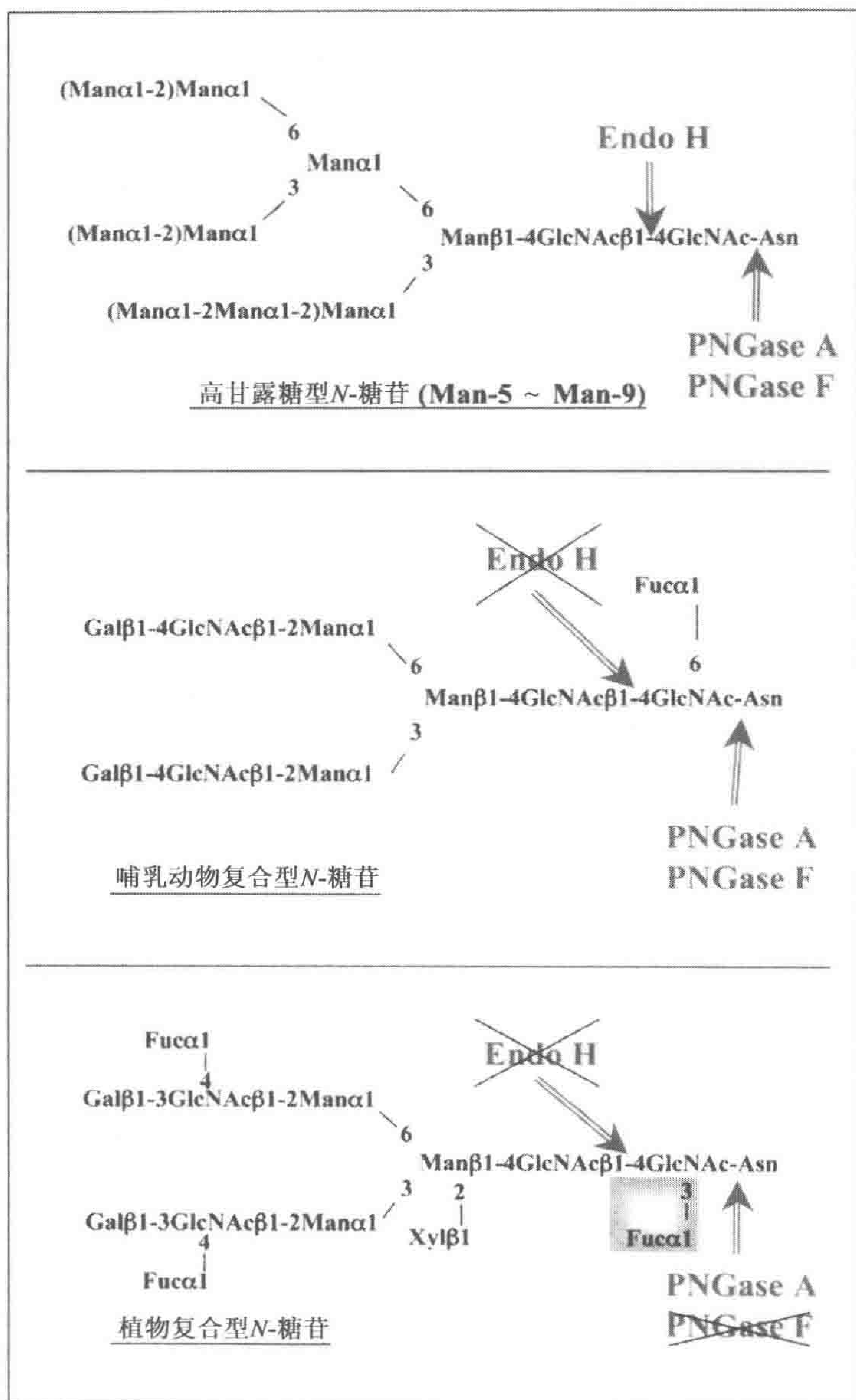


图 25-3　含 *N*-连糖苷蛋白质的酶促去糖基化

高甘露糖型 *N*-糖苷可被内切糖苷酶 H（Endo H）、肽 *N*-糖苷酶 A（PNGase A）或肽 *N*-糖苷酶 F（PNGase F）酶切下来，哺乳动物复合型 *N*-糖苷可被肽 *N*-糖苷酶 A 和肽 *N*-糖苷酶 F 去除掉。由于植物复合型 *N*-糖苷有与中心相连的 α-1-3 岩藻糖，所以它只能被肽 *N*-糖苷酶 A 解离。需要指出的是，肽 *N*-糖苷酶 A 大多只作用于糖肽上，对完整糖蛋白无作用效果

(2) 用 150mmol/L 乙酸钠溶液（pH5.7）将样品稀释 5 倍，加入 10mU 的 Endo H，将混合液在 37℃温育 6h。

(3) 如果酶切后要进行电泳、亲和反应或者免疫检测，那么，要在去糖基化反应后，加入等体积的两倍浓度的电泳样品缓冲液（见 25.3.2 节 1），酶切处理后的样品也可脱盐处理，用于质谱分析。

肽 *N*-糖苷酶 F 去糖基化：

(1) 用含 0.1% SDS 的 0.1mmol/L Tris-HCl（pH7.5）消化处理待酶切的蛋白样品。

(2) 样品在 100℃ 加热 5min，将蛋白质变性。室温下降温，然后加入含 0.5% Nonidet P-40 的等体积的 0.1mmol/L Tris-HCl，pH 7.5（见注释 12）。

(3) 用肽 *N*-糖苷酶 F 37℃温育样品 24h（1U 酶/100μg 蛋白用）。

(4) 酶解消化后，用 4 倍体积的乙醇在－20℃，过夜沉淀去糖基化蛋白质。

(5) 离心样品。回收沉淀中的去糖基化蛋白，并将其溶解在适当的缓冲液中，供凝胶电泳和质谱分析。

肽*N*-糖苷酶 A 去糖基化：

(1) 将 100μg 蛋白质样品溶解在 500μl 的 10mmol/L HCl（pH 2.2）中，加入 10μg 胃蛋白酶，37℃消化 24h，再次加入同样量的胃蛋白酶，继续消化 24h。100℃加热 5min 终止反应。

(2) 冷却样品，然后取 10%的溶液用 C18 色谱柱纯化肽和糖肽混合物。

(3) 用 5mL 乙腈冲洗 C18 层析柱，再用 5mL 水冲洗 C18 层析柱。用蒸馏水将稀释的样品定容至终容积为 1ml，加样到 C18 层析柱。用 5mL 水冲洗柱子去除样品中的盐分，用 5ml 乙腈洗脱结合到柱子上的肽。吹干乙腈浓缩肽样品。用 MALDI-TOF 质谱检测肽和糖肽的分子质量，这样可在内切糖苷酶 A 处理之前，获得糖肽的质量数据。

(4) 将剩余的样品冷冻干燥，溶解在 500μl 的 100mmol/L 乙酸钠溶液（pH 5.5）中。

(5) 将样品用 0.1mU 肽 *N*-糖苷酶 A 在 37℃消化 18h。然后冷冻干燥样品，用 C18 色谱柱，按照步骤（2）和步骤（3）的操作，将肽与寡聚糖分开。通过 MALDI-TOF 质谱分析去糖基化肽，比较去糖基化处理前后得到的两种谱型，得到一些由于 *N*-糖苷的去除引起的离子质量差异，结合去糖基化过程中所使用的酶和植物糖蛋白的信息，来判断蛋白质上 *N*-糖苷的种类和结构形式。

这个实验所需要的试剂都包含在检测试剂盒中，商品酶促去糖基化试剂盒由 Prozyme 公司生产。需要说明的是，按厂家说明使用该试剂盒。实验者可以获得有关被测糖蛋白上的糖苷类型（*N*-和 *O*-连接）的信息。

25.3.3 我的糖基化蛋白在哪

实验人员可通过这个方法获得关于糖苷在蛋白骨架上的分布及糖苷本身的结构信息。这类实验可在纯化的糖蛋白或者从 1D 或 2D 电泳胶上分离出来的蛋白上进行，首先，用蛋白内切酶消化蛋白质，通过高效液相色谱（HPLC）分离消化后的肽和糖肽混合物。对含有糖苷的收集组分进行糖组分分析（见 25.3.2 节 2），接着分别对肽 *N*-糖苷酶 A 处理前后的糖肽组分进行 MALDI-TOF 质谱分析［见 25.3.2 节 3)］[18,19]。

(1) 将 1mg 纯化得到的蛋白质样品溶解在 500μl 的 50mmol/L 碳酸氢铵溶液 (pH 8.0) 中，100℃加热 3min。

(2) 加入 50μg TPCK 处理胰酶，在 37℃处理 2h。

(3) 再次加入 50μg TPCK 处理胰酶，37℃处理 2h。

(4) 如果进行双酶切处理，用 50mmol/L 碳酸氢铵溶液 (pH 8.0) 溶解 50μgTPCK 处理糜蛋白酶，将其加到胰蛋白酶消化液中。37℃处理 2h。

(5) 100℃加热 5min 终止蛋白酶消化反应。

(6) 用反向 HPLC 色谱 (C18 色谱柱) 分离胰蛋白酶/糜蛋白酶消化得到的肽和糖肽，使用 0～60% B 溶液的 60min 线性梯度洗脱，流速为 1ml/min，214nm 紫外监测洗脱峰。A 溶液：含 0.1% TFA (三氟乙酸) 的水/乙腈 (90∶10) 溶液。B 溶液：含 0.1% TFA 的水/乙腈 (10∶90) 溶液。收集各组分容积为 2ml，冷冻干燥收集到的组分。

(7) 各取 10%的收集组分进行糖组分分析 (见 25.3.2 节 2)，挑选含寡聚糖的组分。

(8) 用 MALDI-TOF 质谱分析含糖肽的 HPLC 组分确定糖肽的质量。

(9) 用肽 *N*-糖苷酶 A 消化糖肽 [见 25.3.2 节 3.2)]。如前所述用 C18 色谱柱将肽和寡聚糖分开 [见 25.3.2 节 3.2)]。

(10) 用 MALDI-TOF 质谱分析去糖基化肽，确定其质量。这些质量数据帮助实验人员鉴定被测蛋白质的糖基化位点。检测到的糖基化和去糖基化肽的质量差异将为我们提供糖蛋白上糖苷的结构信息 (表 25-2)。

本实验方法也可以应用于未知序列的蛋白质。在这种情况下，用 LC-MS/MS (液相串联质谱) 分析、确定糖基化肽的氨基酸序列。解离下来的糖苷也可以采用前述的特定流程的 MALDI-TOF 质谱纯化和鉴定[18,19]。

25.3.4　怎样对全糖蛋白质组进行分析

植物提取物内糖蛋白的鉴定可确定以下几点：①哪些基因编码糖蛋白。②潜在糖基化位点上的哪些位点确实发生了糖基化。③糖蛋白上的糖苷的特性与结构是什么。这些研究过程现被称为糖蛋白质组学。在动物细胞中已经实现了这些鉴定实验，但在植物糖蛋白质组鉴定方面还未见报道。

我们实验室最近开发的研究植物糖蛋白质组的策略依赖于固定化凝集素的纯化，1D 或 2D 电泳的分离，以及质谱鉴定。糖蛋白质组的分离有以下两种方法：含高甘露糖型 *N*-糖苷的分泌糖蛋白的纯化和 *O*-GlcNAc 糖基化修饰的糖蛋白的纯化。这里只着重介绍糖蛋白的选择方法，不具体介绍电泳和质谱鉴定。有关这些技术的详细信息请参见本书其他章节。

1. 含高甘露糖型 *N*-糖苷糖蛋白的鉴定

本方法是我们实验室以油菜籽为实验材料建立的，本方法也适用于其他植物材料。

表 25-2　从植物[a]中分离出来的高甘露糖型 *N*-糖苷（Man5～Man9）和复合型 *N*-糖苷的结构及其理论 $(M+Na)^+$ 值

Man5 – m/z=1257 **Man6 – m/z=1419** **Man7 – m/z=1581** **Man8 – m/z=1743** **Man9 – m/z=1905**	(Manα1)-2Manα1 ╲ 6 Manα1 ╲ 3　　　　6 (Manα1)-2Manα1 ╱　Manβ1-4GlcNAcβ1- 4GlcNAc 3 (Manα1-2Manα1)-2Manα1 ╱ **Man5 ～ Man9**
m/z=1065	Manα1 ╲ Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1 ╱　2 │ Xylβ1
m/z=1211	Manα1 ╲ Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1 ╱　2 │ Xylβ1　　3 │ Fucα1
m/z=1414	GlcNAcβ1-2Manα1 ╲ Manβ1- 4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1 ╱　2 │ Xylβ1　　3 │ Fucα1
m/z=1617	GlcNAcβ1-2Manα1 ╲ Manβ1- 4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1 ╱　2 │ Xylβ1　　3 │ Fucα1
m/z=1925	Fucα1 │ 4 Galβ1-3GlcNAcβ1-2 Manα1 ╲ Manβ1- 4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1 ╱　2 │ Xylβ1　　3 │ Fucα1
m/z=2333	Fucα1 │ 4 Galβ1-3GlcNAcβ1-2 Manα1 ╲ Manβ1- 4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1 ╱　2 │ Xylβ1　　3 │ Fucα1 4 │ Fucα1

a 左侧的数值对应于 MALDI-TOF 质谱检测到的 *N*-糖苷所带离子的计算出来的 *m/z*（质量/电荷）值。这个数值表示寡聚糖＋钠离子的质量。

（1）将 6g 植物材料放入 4℃预冷的研钵中，加入 50ml 预冷的 TBS 缓冲液，研磨萃取蛋白质（见注释 13），接着 10 000*g* 离心萃取物 30min，去掉不溶物，然后150 000 *g* 离心 1h，沉淀膜碎片。用 Bradford 蛋白检测方法测定上清液中的可溶性蛋白浓度。将样品分装成每份含 20mg 蛋白质，冷冻贮存备用。

(2) 4℃解冻一份20mg的样品，10 000*g* 离心30min，0.20μm过滤膜过滤去除所有的不溶物。加入冷TBS缓冲液定容至35ml，加入 $CaCl_2$ 和 $MgCl_2$ 至终浓度为1mmol/L。

(3) 将相当于1ml刀豆蛋白A-琼脂糖树脂重悬在50ml TBS* 缓冲液中，用50ml的TBS* 缓冲液冲洗树脂2次，每次冲洗后通过沉降或者离心（3500*g*，10min）回收树脂。

(4) 洗涤后的树脂与35ml样品于4℃，在旋转振荡器上振荡2h。将树脂倒入Poly-Prep®柱子中，冲洗去除未结合在柱子上的蛋白质。

(5) 先用50ml TBS* 缓冲液冲洗树脂5次，再用50ml TBS* 缓冲液冲洗树脂5次，然后如步骤（3）所述方法，用50ml TBS* 缓冲液重悬树脂。

(6) 将树脂倒入Poly-Prep®柱子中，去除残余的TBS* 缓冲液，用10ml含0.3mol/L α-甲基甘露糖TBS* 缓冲液重悬柱子中的树脂。置于4℃旋转振荡1h（见注释14）。

(7) 用15倍体积的含0.3mol/L α-甲基甘露糖的TBS* 缓冲液洗脱糖蛋白，用同样的溶液冲洗树脂，混合这两部分样品，最终的混合物就是纯化的连接高甘露糖型*N*-糖苷的糖蛋白。

(8) 用Bradford蛋白检测方法确定蛋白浓度，在12.5%三氯乙酸（最终浓度）中，4℃过夜沉淀糖蛋白样品。10 000*g* 离心15min沉淀蛋白，用丙酮/水［9∶1（*V/V*）］溶液冲洗沉淀，再次离心。重复洗涤过程两次，将蛋白质溶解在适当的样品缓冲液中供2D电泳分析用。

(9) 用2D凝胶分离糖蛋白，蛋白点通过胶态蓝染色。分别收集每个可视的点（见注释15）。胰蛋白酶酶解收集到的蛋白点。用LC-MS/MS分析酶消化产物。提交获得的肽段序列信息到NCBI非冗余数据库在可选择的物种限制范围内，进行“短的、几乎准确的匹配”blast检索（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）。

一经鉴定，糖蛋白应进行以下两点鉴别：①它们是被分泌出来的，或其有一个潜在的信号肽吗？②它们至少拥有一个潜在的*N*-糖基化位点吗？Predotar（http://genoplante-info.infobiogen.fr/predotar/）、Target P（http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/）或者iPSORT（http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/）等软件可用来判断糖蛋白的亚细胞定位。一个蛋白质中的*N*-糖基化位点可通过与Prosite数据库（http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgibin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html 或 http://www.expasy.org/tools/scanprosite/）比对确定。

2. *O*-位*N*-乙酰葡糖胺糖基化蛋白的鉴定

鉴定*O*-GlcNAc糖蛋白质组需要麦胚凝集素（WGA）亲和层析的糖蛋白纯化。之前的实验表明WGA既可以结合*O*-GlcNAc糖蛋白[27]也可以结合带*N*-糖苷的蛋白质[28]。所以必须预先去除*N*-糖苷，才能用亲和层析柱选择性地纯化*O*位*N*-乙酰葡糖胺糖基化蛋白。这个去糖基化过程可通过能去除高甘露糖型和复合型*N*-糖苷的肽*N*-糖苷酶F来实现。但是如前所述，由于与邻近*N*-糖苷中心GlcNAc连接的α-1-3岩藻糖的

存在，肽 *N*-糖苷酶 F 对植物复合型糖苷的作用很有限［见 25.3.2 节 3.2］。为了克服这个不利因素，要让植物材料保持对 PNGase F 敏感的高甘露糖型糖苷形式。本实验方法是我们实验室开发的用于将 *A. thaliana cgl* 突变体的细胞培养物的 *N*-糖苷转变为 $Man_5GlcNAc_2$ 结构[29]。这个实验方法应该适用于其他的植物材料，实现高甘露糖型 *N*-糖苷的 *N*-糖基化。

(1) 用神奇滤布过滤 150ml 细胞培养物，然后将细胞培养物悬浮在 150ml 0.5mol/L NaCl 溶液中，4℃搅拌 30min 溶解以离子键结合细胞壁上的蛋白质（见注释 16 和注释 17）。

(2) 用神奇滤布再次过滤细胞培养物。弃上清，在含 150mmol/L KCl、2mmol/L $CaCl_2$、10mmol/L $MgCl_2$、1mmol/L DTT 和蛋白酶抑制剂的 30ml 20mmol/L Tris-HCl，pH 7.8（WGA 缓冲液）中研磨细胞培养物。

(3) 4℃下萃取物经 5 500*g* 离心 15min，接着 25 000*g* 离心 30min 后，弃去不溶物，分装到 5ml 管中。

(4) 用 Centricon 离心超滤管（Amicon Bioseparation YM-10）将 5ml 的组分浓缩到 0.5ml。

(5) 浓缩后，加 SDS 到样品中使其含有 0.1% SDS，100℃加热 5min 变性处理糖蛋白。再加入 Nonidet P40 使其终浓度为 0.5%（见注释 12）。蛋白质处理变性后，加入 PNGase F（5 U），37℃搅动温育 24h 进行蛋白质去糖基化反应。这一步骤中，只有 *N*-糖苷被消除掉。

(6) 用 WGA 缓冲液将去糖基化样品稀释 20 倍，将其与 100μl WGA-琼脂糖混合，4℃旋转振荡 4h。用柱体积 20 倍的 WGA 缓冲液冲洗树脂去除未结合在柱子上的蛋白质。

(7) 为了洗脱结合在柱子上的蛋白质，将树脂与 5～10 倍体积的含 0.5mol/L GlcNAc 的 WGA 缓冲液在 4℃混合 30min（见注释 18）。收集洗脱液，重复相同的洗脱处理一次。合并这两次洗脱液，这个糖蛋白组分只含有 *O* 位 *N*-乙酰葡糖胺糖基化蛋白质。

(8) 加入三氯乙酸达到终浓度为 12.5%，4℃过夜沉淀糖蛋白。10 000*g* 离心 15min 沉淀蛋白质，用丙酮/水［9∶1 (*V*/*V*)］溶液洗涤蛋白沉淀 3 次，将蛋白质沉淀物悬浮在一种适当的缓冲液中供 1D 电泳备用。

(9) 用 1DSDS-PAGE 凝胶电泳分离 *O* 位 *N*-乙酰葡糖胺糖基化蛋白质。经考马斯亮蓝染色后，收集胶内的所有可见条带，经胰蛋白酶消化后，用 MALDI-TOF 或 LC-MS/MS 鉴定蛋白质。

25.3.5　结论与展望

应用本章所列的实验方法可获得一个植物糖蛋白的糖苷及其组成单元、连接方式的信息。这里讨论的方法可用来有效鉴定 *N*-糖苷，但对 *O*-糖苷的分析还需要进一步的努力。

即使了解了植物糖苷的生理生化特性，也很难推测由一种糖蛋白或一种寡聚糖调节

的功能。事实上，相同的寡糖序列连接到不同的糖蛋白上，或出现在植物体内不同的位置，亦或出现在植物生活周期的不同时间，都可能表现出不同的功能。因此，新兴的糖蛋白质组学研究正，为了解 *N*-糖苷和 *O*-糖苷的作用，开劈一条新的途径。缩短这一领域的差距将拓展我们对于植物生理学的认识，也为生物化学和医学提供了更加广阔的前景。

25.4 注　　释

(1) 每个实验均使用新鲜的 3mol/L 甲醇-HCl 和硅烷化试剂。

(2) 要仔细识别蛋白质印迹，因为 WGA 既能识别 *N*-糖苷的 GlcNAc，也能识别 *O*-GlcNAc。

(3) 用于在硝酸纤维素印迹膜上封闭结合位点的溶液应避免糖蛋白污染。所以我们建议在这一步骤中使用 Tween-20 来覆盖硝酸纤维素膜[30]。

(4) 特异性对照：

a. 建议印迹表 25-1 中的蛋白质到硝酸纤维素膜（建议的正对照），获得亲和检测的正对照。

b. 凝集素结合特异性应在 0.3mol/L 抑制性糖（表 25-1）浓度下进行亲和检测验证。

(5) 可用的抗 *O*-糖苷抗体有：抗 AGP 抗体：LM2[31,32]、JIM4、JIM13、JIM15[32]、JIM8[33]、JIM14、JIM15 和 JIM16[34]；抗伸展蛋白抗体：LM1[35]、JIM11、JIM12、JIM20[36]和 JIM 19[37]。

(6) 免疫检测的 *N*-糖苷特异性对照：应验证血清对连接在被测蛋白的 *N*-糖苷的特异性，可在免疫检测前先对印迹进行温和的高碘酸盐氧化处理，温和高碘酸盐处理会氧化糖苷，并消除糖蛋白上抗苷抗体的识别位点。剩下的信号都是蛋白骨架抗体识别的结果[38]。

a. 经明胶饱和处理后，将蛋白质印迹膜浸泡在 100mmol/L 含 100mmol/L 过碘酸钠的乙酸钠缓冲液（pH 4.5）中，室温下黑暗处理 1h，30min 后更换一次浸泡液。

b. 将蛋白质印迹膜浸泡在含 50mmol/L 硼氢化钠的 PBS 缓冲液中，室温下处理 30min。

c. 用 TBS 漂洗蛋白质印迹膜，用含 1%凝胶的 TBS 浸泡蛋白质印迹膜 15min，进行如 25.3.2 节 1.1）所述的免疫检测实验。

(7) 岩藻糖或者木糖的特异性对照：有些蛋白质可被用作 *N*-糖苷免疫检测的正对照，源自蜂毒的磷脂酶含有 α-1-3 岩藻糖残基，不含 β-1-2 木糖[39]。源自玉米的 PHA-L（植物血凝素 L）和重组抗生物素蛋白是既含 β-1-2 木糖，也含 α-1-3 岩藻糖的糖蛋白[18,40,41]。

(8) 这里介绍的方法需要 1mg 蛋白质，较少的蛋白质使用量也适用。

(9) 用肌醇做内标。

(10) 由于还原性氨化反应是一种激烈的处理，可能会发生一些蛋白质修饰。为此，有时候最好酶切去除 *O*-糖苷。

(11) 总的来说，我们实验室不使用化学处理解离糖蛋白上的 *N*-糖苷。

(12) Nonidet P40 的作用是结合游离的 SDS。

(13) 需要 60～80mg 的可溶油菜籽蛋白作为初始材料，制备足够跑一张 2D 凝胶的糖蛋白。

(14) *α*-甲基甘露糖是刀豆蛋白 A 的配体，它将替换固定化凝集素上的糖蛋白。

(15) 在洗脱亲和色谱柱时，我们观察到一个重要的解离物质刀豆蛋白 A。这一解离物质污染了糖蛋白制备物，迫使我们必须同时跑一张分析用 2D 凝胶，另一张 2D 凝胶只上样刀豆蛋白 A。染色后，我们选择只在分析用 2D 凝胶上出现的点，弃除同时在这两张 2D 凝胶上出现的点。

(16) 150ml 生长 6 天的拟南芥 *cgl* 突变体细胞培养物大约相当于 10g 植物材料。

(17) 细胞壁结合蛋白的去除是纯化的第一步，因为这些蛋白不含 *O* 位 *N*-乙酰葡糖胺。如果需要就应将这一纯化步骤包括在这个方法中。

(18) 自由 *O* 位 *N*-乙酰葡糖胺是 WGA 的配体，它将替换固定凝集素上的糖蛋白。

致谢

感谢我们实验室现在和从前那些为本文稿记述的实验方法的开发和优化做出贡献的同事们。法国鲁昂大学的糖生物学工作受法国 Ministère de la Recherche 和 the Centre National de la Recherche Scientifique（CNRS）的资助。感谢 Genoplante II（批准号：AF 2001069）和 FEDER（批准号：1013）基金对植物糖蛋白质组学初期研究的资助。感谢 V. Gomord 协调 Genoplante II 项目“*A. thaliana* 种子的糖蛋白质组”。

参 考 文 献

1. Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A.-C., Gomord, V., and Faye, L. (1998) *N*-glycosylation biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol. Biol.* **3,** 31–48.
2. Cho, Y. P. and Chrispeels, M. J. (1976) Serine-*O*-galactosyl linkages in glycopeptides from carrot cell wall. *Phytochemistry* **15,** 165–169.
3. Matsuoka, K., Watanabe N., and Nakamura K. (1995) *O*-glycosylation of a precursor to a sweet potato protein, sporamin, expressed in tobacco cells. *Plant J.* **8,** 877–889.
4. Faye, L., Boulaflous, A., Benchabane, M., Gomord, V., and Michaud, D. (2005) Protein modifications in the plant secretory pathway: current states and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* **23,** 1770–1778.
5. Schowalter, A. M. (1993) Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* **5,** 9–23.
6. Moore, P. J., Swords, K. M. M., Lynch, M. A., and Staehelin, L. A. (1991) Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *J. Cell Biol.* **112,** 467–479.
7. Robinson, D., Andreae, M., and Sauer, A. (1985) Hydroxyproline-rich glycoprotein biosynthesis: a comparison with that of collagen, in *Biochemistry of Plant Cell Walls* (Brett, C. T. and Hillman, J. R., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 155–176.

8. Schowalter, A. M. (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol. Sci.* **58,** 1399–1417.
9. Hart, G. (1999) The *O*-GlcNAc modification, in *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 183–194.
10. Slawson, C. and Hart, G. (2003) Dynamic interplay between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate: the sweet side of protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13,** 631–636.
11. Jacobsen, S. E., Binkowski, K. A., and Olszewski, N. E. (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93,** 9292–9296.
12. Thornton, T. M., Swain, S. M., and Olszewski, N. E. (1999) Gibberellin signal transduction presents ellipsis the SPY who *O*-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* **4,** 424–428.
13. Hartweck, L. M., Scott C. L., and Olsewski, N. E. (2002) Two *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase genes of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. have overlapping functions necessary for gamete and seed development. *Genetics* **161,** 1279–1291.
14. Heese Peck, A., Cole, R. N., Borkhsenious, O. N., Hart, G. W., and Raikhel, N. V. (1995) Plant nuclear pore complex proteins are modified by novel oligosaccharides with terminal *N*-acetylglucosamine. *Plant Cell* **7,** 1459–1471.
15. Heese Peck, A. and Raikhel, N. V. (1998) A glycoprotein modified with terminal N-acetylglucosamine and localized at the nuclear rim shows sequence similarity to aldose-1-epimerases. *Plant Cell* **10,** 599–612.
16. Holst, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C., and Winther, J. R. (1996) Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **15,** 3538–3546.
17. Faye, L., Sturm, A., Bollini, R., Vitale, A., and Chrispeels, M. J. (1986) The position of the oligosaccharide side-chains of phytohemagglutinin and their accessibility to glycosidases determines their subsequent processing in the Golgi. *Eur J. Biochem.* **158,** 655–661.
18. Bardor, M., Loutelier-Bourhis, C., Marvin, L., et al. (1999) Analysis of plant glycoproteins by matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry: application to the *N*-glycosylation of bean phytohemagglutinin. *Plant Physiol. Biochem.* **37,** 319–325.
19. Bardor, M., Faye, L., and Lerouge, P. (1999) Analysis of the *N*-glycosylation of recombinant glycoproteins produced in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* **4,** 376–380.
20. Faye, L. and Chrispeels, M. J. (1985) Characterization of *N*-linked oligosaccharides by affinoblotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal. Biochem.* **149,** 218–224.
21. Faye, L., Gomord, V., Fitchette-Lainé, A.-C., and Chrispeels, M. J. (1993) Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing α1->3 fucose or β1->2 xylose. *Anal. Biochem.* **209,** 104–108.
22. Fitchette-Lainé, A.-C., Gomord V., Cabanes M., et al. (1997) *N*-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J.* **12,** 1411–1417.
23. Tomiya, N., Kurono, M., Ishihara, H., et al. (1987) Structural analysis of *N*-linked oligosaccharides by a combination of glycopeptidase, exoglycosidases, and high-

performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* **163,** 489–499.

24. Ogawa, H., Hijikata, A., Amano, M., et al. (1996) Structures and contribution to the antigenicity of oligosaccharides of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen allergen *Cry j* I: relationship between the structures and antigenic epitopes of plant *N*-linked complex-type glycans. *Glycoconjugate J.* **13,** 555–566.
25. Linsley, K. B., Chan, S. Y., Chan, S., Reinhold, B. B., Lisi, P. J., and Reinhold, V. N. (1994) Applications of electrospray mass spectrometry to erythropoietin *N*- and *O*-linked glycans. *Anal. Biochem.* **219,** 207–217.
26. Jesperson, S., Koedam, J. A., Hoogerbrugge, C. M., Tjadn, U. R., Van der Greef, J., and Van den Brande, J. L. (1996) Characterization of *O*-glycosylated precursors of insuline-like growth factor II by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **31,** 893–900.
27. Hanover, J. A., Cohan, C. K., Willingham, M. C., and Park, M. K. (1987) *O*-linked *N*-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. *J. Biol. Chem.* **262,** 9887–9894.
28. Roquemore, E. P., Chou, T.-Y., and Hart, G. W. (1994) Detection of *O*-linked *N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins. *Methods Enzymol.* **230,** 443–460.
29. von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., and Chrispeels, M. J. (1993) Isolation of a mutant *Arabidopsis* plant that lacks *N*-acetyl glucosaminyl transferase I and is unable to synthesize Golgi-modified complex *N*-linked glycans. *Plant Physiol.* **102,** 1109–1118.
30. Bird, C. R., Gearing, A. J. H., and Thorpe, R. (1988) The use of Tween-20 alone as a blocking agent for the immunoblotting can cause artefactual results. *J. Immunol. Methods* **106,** 175–179.
31. Smallwood, M., Yates, E. A., Willats, W. G. T., Martin, H., and Knox, J. P. (1996) Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* **198,** 452–459.
32. Yates, E. A., Valdor, J.-F., Haslam, S. M., et al. (1996) Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiology* **6,** 131–139.
33. Pennell, R. I., Janniche L., Kjellbom, P., Scofield, G. N., Peart, J. M., and Roberts, K. (1991) Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell* **3,** 1317–1326.
34. Knox, J. P., Linstead, P. J., Peart, J., Cooper, C., and Roberts, K. (1991) Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* **1,** 317–326.
35. Smallwood, M., Martin, H., and Knox, J. P. (1995) An epitope of rice threonine- and hydroxyproline-rich glycoprotein is common to cell wall and hydrophobic plasma-membrane glycoproteins. *Planta* **196,** 510–522.
36. Smallwood, M., Beven, A. Donovan, N., et al. (1994) Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex. *Plant J.* **5,** 237–246.
37. Knox, J. P., Peart, J., and Neill, S. J. (1995) Identification of novel cell surface epitopes using a leaf epidermal-strip assay system. *Planta* **196,** 266–270.
38. Lainé, A.-C. and Faye, L. (1988) Significant immunological cross-reactivity of plant glycoproteins. *Electrophoresis* **9,** 841–844.
39. Kubelka, V., Altmann, F., Staudacher, E., et al. (1993) Primary structures of the

N-linked carbohydrate chains from honeybee venom phospholipase A_2. *Eur. J. Biochem.* **213,** 1193–1204.

40. Vitale, A., Warner, T. G., and Chrispeels, M. J. (1984) *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin contains high-mannose and modified oligoasaccharide chains. *Planta* **160,** 256–263.
41. Bardor, M., Loutelier-Bourhis, C., Paccalet, T., et al. (2003) Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a *N*-glycosylation that is homogeneous and suitable for glyco-engineering into a human-compatible structure, *Plant Biotech. J.* **1,** 451–462.
42. Shibuya, N., Goldstein, I. J., van Damme, E. J. M., and Peumans, W. J. (1988) Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivealis*) bulb. *J. Biol. Chem.* **263,** 728–734.
43. Animashaun, T., Mahmood, N, Hay, A. J., and Hughes, R. C. (1993) Inhibitory effect of novel mannose-binding lectins on HIV-infectivity and syncitium formation. *Antiv. Chem. Chemother.* **4,** 145–153.
44. Nagata, Y. and Burger, M. M. (1974) Wheat germ agglutinin. Molecular characteristics and specificity for sugar binding. *J. Biol. Chem.* **249,** 3116–3122.

第 26 章　鉴定分析植物蛋白复合物的蓝绿非变性凝胶电泳

Jesco Heinemeyer，Dagmar Lewejohann 和 Hans-Peter Braun

摘要　高分辨率的蛋白质分离是蛋白质组学研究的一个重要条件，蛋白质的分离主要依赖于 2D IEF/SDS-PAGE，不幸的是，这种技术分离疏水性蛋白质的能力较差，而且不能用于研究自然状态的非变性蛋白质。蓝绿非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）表现出一种可替代 2D IEF/SDS-PAGE 的蛋白质分离方法，这种方法基于用阴离子染料考马斯亮蓝将负电荷整合到蛋白质或蛋白复合物上，进行天然状态下的蛋白质分析。结合 SDS-PAGE 电泳，第一相蓝绿胶上被分离的蛋白复合物在第二相 SDS-PAGE 凝胶上被分离成其蛋白质亚基组分，在 2D 凝胶上形成竖条的点。2D 蓝绿胶 SDS-PAGE 是蛋白质组学研究中 2D IEF/SDS-PAGE 的理想补充技术。

关键词　蓝绿非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳；膜蛋白；蛋白复合物；线粒体；质体；呼吸链；光合作用

26.1　前　　言

蓝绿非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（BN-PAGE）最先由 Hermann Schägger 开发出来，并被用于优化线粒体和细菌的膜结合蛋白质的分析和鉴定[1]。这种方法的最初理念是在电泳之前，先将蛋白复合物与蛋白质染料考马斯亮蓝混合在一起。在中性 pH 点上，考马斯亮蓝是一种带负电荷的分子，这时它可将负电荷引入到蛋白质复合物中。与十二烷基硫酸钠（SDS）的作用相反，那些负电荷不结合到去折叠或解体的蛋白质复合物上。如果考马斯亮蓝渗透进去的蛋白质组分能在低百分浓度的聚丙烯酰胺凝胶上被分离，那么蛋白复合物的亚基就会在 SDS 存在的情况下，通过第一相的 BN-PAGE 电泳和第二相的 SDS-PAGE 电泳被分离出来。在 2D 凝胶上，蛋白点沿着竖条排列，便于指认这些蛋白复合物。第一相凝胶能分离天然状态下的蛋白质和蛋白复合物，并可用多种胶内染料染色[2-4]，BN-PAGE 对分离膜结合蛋白复合物特别有用，因为这些蛋白复合物常常缺乏用电泳方法分离天然蛋白质所必需的内部电荷。制备膜组分样品时，需要在考马斯亮蓝染色前，添加去垢剂来增溶膜蛋白，一般使用与天然蛋白质条件一致的温和的非极性去垢剂。BN-PAGE 也被发现对分离可溶性蛋白质和蛋白复合物很有用。

如今 BN-PAGE 是一种对研究蛋白质组分非常重要的基础生化方法，已在蛋白质组学中广泛应用，其应用范围包括：植物线粒体[5-10]、质体[11-15]、细胞质膜[16]、质外体[4]及多种有特定生化特性的组分[17-21]。BN-PAGE 的科学目的一方面要实现对细胞及亚细

胞组分中蛋白复合物的系统分析（图 26-1），另一方面也要实现对具体蛋白复合物的特殊分析。在对具体蛋白复合物进行特殊分析方面，BN-PAGE 可替代像分析超速离心和凝胶过滤色谱层析这样的分离蛋白复合物的其他生化方法。与这两种方法相比，BN-PAGE 具有更高的分辨率。

26.2　材　　料

26.2.1　BN-PAGE 样品的制备

（1）十二烷基 β-D-麦芽糖苷增溶液：1.0%十二烷基 β-D-麦芽糖苷（Roche，Basel，Switzerland），50mmol/L BisTris，750mmol/L 氨基乙酸，0.5mmol/L EDTA，pH7.0，4℃贮藏备用。使用前加入苯甲基磺酰氟（PMSF）[终浓度为 2mmol/L，储液配制：200mmol/L PMSF（*m/V*）溶解在乙醇溶液中]。

（2）TritonX-100 增溶液：1.0% TritonX-100（Sigma，St. Louis，MO），50mmol/L 咪唑盐酸，50mmol/L 氯化钠，2mmol/L 氨基乙酸，0.5mmol/L EDTA，10%（*V/V*）甘油，pH7.4，4℃贮藏备用。使用前加入苯甲基磺酰氟（PMSF）[终浓度为 2mmol/L，储液配制：200mmol/L PMSF（*m/V*）溶解在乙醇溶液中]。

（3）洋地黄皂苷增溶液：5.0%洋地黄皂苷（Fluka，Buchs，Switzerland），30mmol/L HEPPS，150mmol/L 乙酸钾，10%（*V/V*）甘油，pH7.4，4℃贮藏备用。这个增溶液要新鲜配制，配制时短时间加热到 98℃，溶解洋地黄皂苷。使用前加入苯甲基磺酰氟（PMSF）[终浓度为 2mmol/L，储液配制：200mmol/L PMSF（*m/V*）溶解在乙醇溶液中]。

（4）考马斯亮蓝染色液：5%考马斯亮蓝 G-250（Merck，Darmstadt，Germany），750mmol/L 氨基乙酸。

26.2.2　BN-PAGA

（1）丙烯酰胺溶液：49.5%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺（32∶1）（AppliChem，Darmstadt，Germany）。

（2）BN 凝胶缓冲液（6×）：1.5mmol/L 氨基乙酸，150mmol/L BisTris，pH7.0，4℃贮藏备用。

（3）BN 阴极缓冲液（5×）：250mmol/L Tricine，75mmol/L BisTris，0.1%（*m/V*）考马斯亮蓝 G-250（Merck，Darmstadt，Germany），pH7.0，4℃贮藏备用。

（4）BN 阳极缓冲液（6×）：300mmol/L BisTris，pH7.0，4℃贮藏备用。

26.2.3　第二相的 SDS-PAGE

（1）丙烯酰胺溶液：49.5%丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺（32∶1）（AppliChem）。

（2）SDS 凝胶缓冲液：3mol/L Tris-HCl，0.3%（*m/V*）SDS，pH8.45。

（3）BN 凝胶缓冲液（6×）：见 26.2.2。

（4）SDS 阴极缓冲液：0.1mol/L Tris-HCl，0.1mol/L Tricine，0.1%（*m/V*）

SDS，pH8.25。

（5）SDS阳极缓冲液：0.2mol/L Tris-HCl，pH8.9。

（6）封胶液：1mol/L Tris-HCl，0.1%（*m/V*）SDS，pH8.45。

（7）变性处理液：1.0%（*m/V*）SDS，1.0%（*m/V*）*β*-巯基乙醇。

（8）SDS溶液：10%（*m/V*）SDS。

26.2.4 染色

（1）溶液A：2%（*m/V*）磷酸，10%硫酸铵。

（2）溶液B：5%（*m/V*）考马斯亮蓝G-250（Merck）。

（3）固定液：40%（*V/V*），甲醇，10%乙酸。

（4）染色液：98%（*V/V*）溶液A，2%（*V/V*）溶液B，使用前一天配制染色液，振摇数小时，最好过夜振摇。

26.3 方　法

26.3.1 BN-PAGE样品的制备

所有样品制备步骤必须在4℃下操作，在开始制备样品前（见26.3.1节1和26.3.1节2），要制备好BN凝胶（见26.3.2）。

1. 膜组分

（1）按照标准的方法步骤制备要研究的膜组分，如细胞质膜、类囊体膜或线粒体膜[14,16,22]。或者使用完整细胞器，如质体、线粒体或过氧化物酶体，作为BN-PAGE的初始实验材料。

（2）确定蛋白质浓度，如用Lowry方法等。

（3）将蛋白质浓度调为10μg/μl。

（4）15 000*g*离心100μl样品10min，沉淀膜或细胞器组分。

（5）用十二烷基*β*-D-麦芽糖苷，TritonX-100或洋地黄皂苷增溶液悬浮沉淀物（见注释1）。

（6）将悬浮液置于冰上15min。

（7）20 000*g*离心20min，去除不容物。

（8）加入5μL考马斯亮蓝染色液。

（9）直接加样50～100μl的上清液（相当于0.5～1.0mg蛋白质）到BN胶上（蛋白质的定量为可被考马斯亮蓝染色，如用银染，蛋白质量可减少到1/10）。

2. 水溶解组分

（1）按照标准方法制备要研究的水溶性蛋白质，所用的缓冲液不能含高盐浓度或者离子去垢剂。蛋白质浓度要调节到10μg/μl。

（2）在100μl样品中加入2μl考马斯亮蓝染色液。

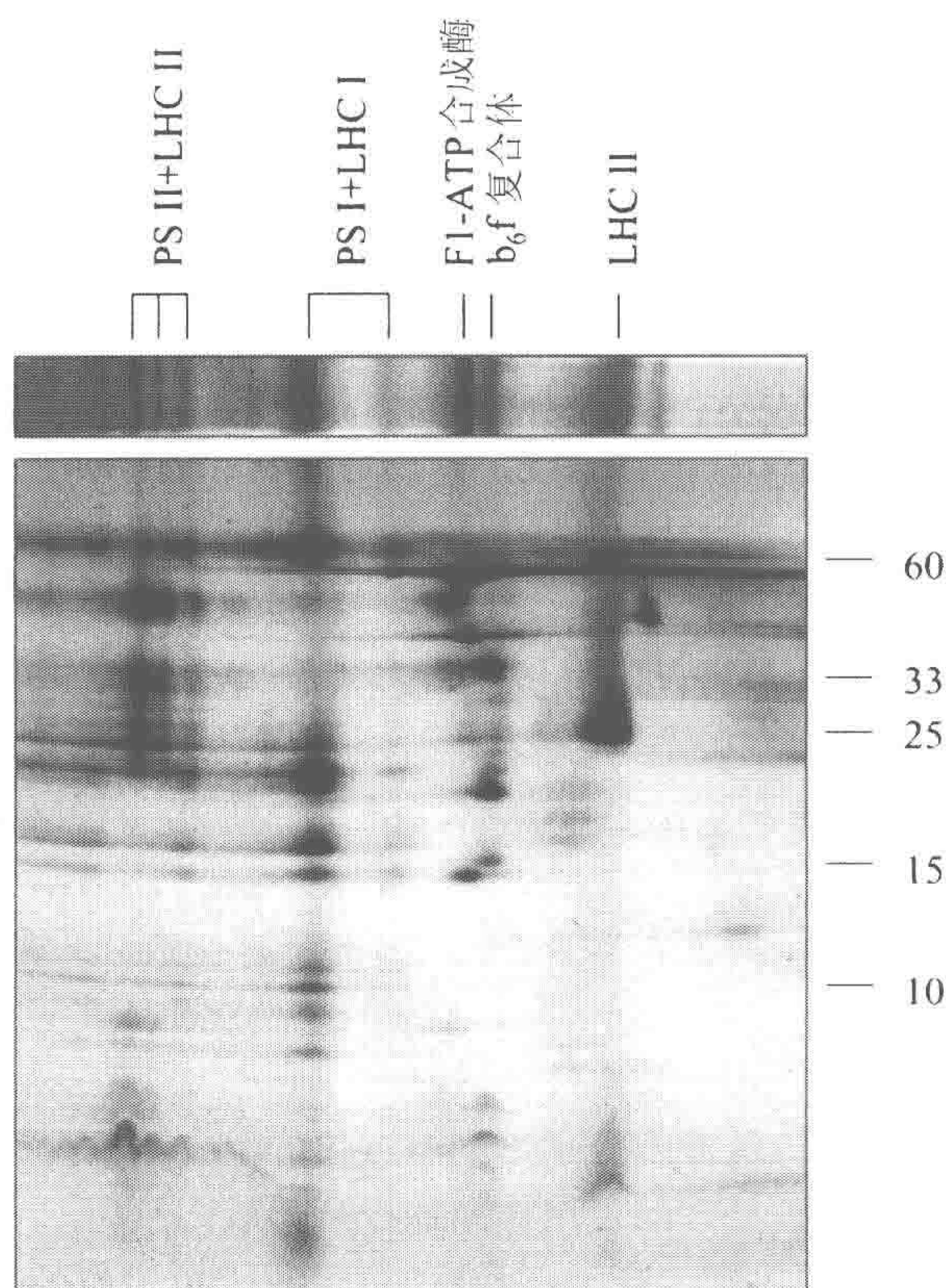


图26-1 用2D BN-PAGE分离拟南芥叶绿体蛋白复合物

洋地黄皂苷增溶蛋白质，考马斯亮蓝染色凝胶，右边的数字为标准蛋白质分子质量。PS II，光合作用系统II；PS I，光合作用系统I；LHC II，捕光色素蛋白复合物II；LHC I，捕光色素蛋白复合物I；F_1-ATP酶，ATP合成酶的F_1亚基；b_6f复合物，细胞色素b_6f复合物

(3) 20 000g离心20min，去除不溶物。

(4) 直接加样50～100μl的上清液（相当于0.5～1.0mg蛋白质）到BN胶上（如用银染，减少蛋白样品的加样量，见26.3.1节1中第(a)步骤）。

26.3.2 BN-PAGE

如果电泳分离距离大于12cm，BN凝胶就可以获得最好的分辨能力。下面所介绍的方法是在Bio-Rad公司的Protein II电泳仪（Bio-Rad，Richmond，CA；凝胶尺寸：0.15cm×16cm×20cm）上做的实验，其他公司生产的电泳仪，如Hoefer SE-400或SE-600电泳仪（GE Healthcare，Munich，Germany），也同样适用于BN-PAGE电泳。由于蛋白复合物的分子质量可从50kDa到几千kDa，所以有时要用到梯度凝胶来分离（见注释2）。

(1) 将1.8ml丙烯酰胺溶液，3.3ml BN凝胶缓冲液，14.9ml双蒸水混合在一起，配制成4.5%分离胶溶液。

（2）将 6.7ml 丙烯酰胺溶液，3.3ml BN 凝胶缓冲液，6.0ml 双蒸水，4ml 甘油混合在一起，配制成 16％分离胶溶液。

（3）将这两种溶液分别灌入梯度生成器中，在这个梯度生成器上连接软管和针头，并与做胶的两块玻璃板之间的空间连接，这样就可以从顶部灌胶（16％分离胶溶液先灌进两块玻璃板之间），或从底部灌胶（4.5％分离胶溶液先灌进两块玻璃板之间）。

（4）在这两种凝胶溶液中加入 TEMED 和 APS（90μl 10％ APS/9μl TEMED 加入到 4.5％分离胶溶液中；65μl APS/6.5μl TEMED 到 16％分离胶溶液中）。

（5）灌梯度胶，在顶部为浓缩胶留一定的空间，用双蒸水封胶液，凝胶将在 60min 内聚合。

（6）倒掉双蒸水。

（7）将 1.2ml 丙烯酰胺溶液，2.5ml BN 凝胶缓冲液，11.3ml 双蒸水混合在一起，配制成浓缩胶溶液。

（8）在浓缩胶溶液中加入 65μl APS 和 6.5μl TEMED，将其倒入插梳周围的空间，浓缩胶将在 30min 内聚合。

（9）稀释相应的电泳缓冲液的浓缩储液，分别制备成 1× 的阳极和阴极电泳缓冲液。

（10）当浓缩胶聚合后，小心移走插梳。

（11）将阳极和阴极电泳缓冲液分别加到电泳仪的上、下槽内，冷却电泳仪到 4℃。

（12）将经考马斯亮蓝预处理的蛋白样品加样到凝胶凹槽里。

（13）将电泳仪与稳压电源连接，一开始时，100V 恒定电压电泳 45min，接着以 15A 恒定电流电泳 8h。要在 4℃电泳，电泳过程中可看到 BN 胶上的条带。

26.3.3 第二相的 SDS-PAGE

1D BN-PAGE 分离的蛋白复合物可用考马斯亮蓝染色或银染，用胶内酶学检测了解其活性，或转移到印迹膜进行进一步的分析（见注释 3 和注释 4）。用第二相有 SDS 存在的凝胶电泳能分离出蛋白复合物的亚基组分，所有已发表的 SDS-PAGE 实验方法都可与 BN-PAGE 结合，如 Laemmli 发表的电泳系统[24]。但是一般来说，Schägger 和 von Jagow[25]开发的 Tricine-SDS PAGE 系统的分辨率最高。下面所介绍的方法是在 Bio-Rad 公司的 Protein II 电泳仪（Bio-Rad，Richmond，CA；凝胶尺寸：0.15 cm×16 cm×20 cm）上做的实验，其他公司生产的电泳仪也同样适用。

（1）剪下一条 BN 胶，室温下将其浸泡在变性处理溶液中 30min。

（2）用双蒸水冲洗胶条 30～60s（这一步骤很重要，因为 β-巯基乙醇抑制丙烯酰胺的聚合）。

（3）将胶条放在电泳仪的玻璃板上的正常胶梳的梳齿位置上。

（4）再用 1mm 橡皮密封条、第二块玻璃板和夹子等，组装凝胶电泳仪。将所有需要的东西倒入灌胶器中（与第一向的胶条厚度（1.5 mm）相比，减少第二向凝胶的厚度到 1.0mm，以避免第二向胶条沿着垂直方向滑落下去）。

（5）将 10ml 的丙烯酰胺溶液、10ml 的 SDS 凝胶缓冲液、10ml 双蒸水、100μl 的

APS 和 10μl 的 TEMED 混合在一起，配制成 16%分离胶溶液，将其倒入电泳仪两块玻璃板之间的 BN 胶条以下的空间，为嵌入 BN 胶条的样品胶溶液留下空间。用封胶溶液封胶面，大约 60min 内凝胶聚合。

(6) 将 4.1ml 的丙烯酰胺溶液、6.7ml 的 BN 凝胶缓冲液、2ml 甘油、200μl 的 SDS 溶液、6.8ml 双蒸水、160μl 的 APS 和 16μl 的 TEMED 混合在一起，配制成 10% 样品胶溶液。

(7) 倒掉封胶溶液，倒入样品胶将 BN 胶条嵌入，倾斜凝胶架子，使 BN 胶条下面的空气释放出来。

(8) 分别在电泳仪的上、下槽加入 SDS 阳极和阴极电泳缓冲液。

(9) 将电泳仪接上稳压电源，30mA 电流下，电泳过夜。

作为一个替代系统，第二向电泳可在天然条件下进行（见注释 7）。

26.3.4　染色

用所有的标准蛋白质染色方法可以显色 2D BN 凝胶上分离的蛋白质，如考马斯亮蓝染色、银染、荧光染料染色等。如果接着用质谱仪鉴定蛋白质，建议使用考马斯亮蓝染色，下面介绍由 Neuhoff 等[26,27]开发的基于胶态考马斯亮蓝染色的实验指导。

(1) 将凝胶在固定液中固定处理 1h。

(2) 混合 80ml 新鲜配制的染色液和 20ml 乙醇溶液。

(3) 将凝胶浸泡在上述溶液中过夜。

(4) 用双蒸水冲洗凝胶，脱色，要中途换水直至背景清晰（如果背景颜色无法用水脱除，可使用 20%的乙醇溶液脱色）。

26.4　注　　释

(1) 用于增溶膜蛋白的去垢剂浓度要进行优化调整。十二烷基 β-D-麦芽糖苷和 TritonX-100 的使用浓度通常在 0.1%～2.0%，洋地黄皂苷的使用浓度通常在 1%～10%。

(2) 若要分离大分子质量的蛋白质复合物（>3MDa），用 BN 胶缓冲液配制 2.5% 琼脂糖凝胶代替聚丙烯酰胺梯度胶[28]。

(3) BN 胶能在天然或变性（SDS 存在）的条件下，被印迹转移。为去除胶上过多的考马斯亮蓝，需要进行简短的预印迹处理，或在电泳完成一半时，用不含考马斯亮蓝的 BN 阳极缓冲液替代原先使用的 BN 阳极缓冲液。从 1D BN 胶上切下来的蛋白复合物可被进一步的电洗脱、沉淀和凝胶分析，如 2D IEF/SDS-PAGE。一种相应的 3D 系统（BN/IEF/SDS-PAGE）被认为对分离拟南芥中蛋白复合物的亚基成分的异构体有用[29]。

(4) BN-PAGE 与胶内酶学染色兼容，方法见参考文献 3。

(5) 当将 Tricine SDS-PAGE 用作第二向凝胶电泳时，Schägger 和 von Jagow[25]最先建议使用由 16%和 10%凝胶组成的二向分离胶。这种稍微复杂些的凝胶系统可较好地分离大蛋白质的亚基，其中一种凝胶灌在另一种凝胶上方。在 16%的凝胶溶液中加

入甘油，防止它与10%凝胶溶液相混，具体见 Schägger 和 von Jagow 的文章[25]。

（6）将 BN 胶条嵌入到第二向凝胶的样品槽位置，以实现 BN 胶条转移到第二向凝胶上，这样做是为了使 BN 胶条与第二向的 SDS 凝胶能更好地胶面接触。但是，正如通常在 2D IEF/SDS-PAG 所做的，BN 胶条也可以用琼脂糖将其固定在第二向的 SDS 凝胶上。这两种凝胶的胶面接触可能无需改进了，但要在完成第一向电泳后，尽快进行第二向电泳。

（7）第一和第二向同为 BN-PAGE 的也可以结合起来使用[30]，在这种情况下，两向 BN 胶电泳通常是在不同去垢剂存在下进行的。例如，第一向 BN-PAGE 可在洋地黄皂苷存在下进行，而第二向可在十二烷基 β-D-麦芽糖苷存在下进行。所有同时在这两种去垢剂中状态稳定的蛋白复合物最终定位在这个凝胶系统的一条斜线上。相反，那些在第二种去垢剂中不稳定的蛋白复合物被分解为具有较高电泳迁移的亚复合物。这种 2D 凝胶系统能很好地用来研究蛋白复合物的高级结构。

（8）增加染色时间到 3 天，可进一步加强蛋白质检测的敏感性。

致谢

本项工作得到德意志研究联合会的资助（grant Br 1829-7/1）。

参 考 文 献

1. Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199,** 223–231.
2. Grandier-Vazeille, X. and Guerin, M. (1996) Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal. Biochem.* **242,** 248–254.
3. Zerbetto, E., Vergani, L., and Dabbeni-Sala, F. (1997) Quantitation of muscle mitochondrial oxidative phosphorylation enzymes via histochemical staining of blue native polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **18,** 2059–2064.
4. Fecht-Christoffers, M. M., Braun, H. P., Guillier, C., VanDorssealer, A., and Horst W. J. (2003) Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Physiol.* **133,** 1935–1946.
5. Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9,** 357–368.
6. Eubel, H., Jänsch, L., and Braun, H. P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria: supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* **133,** 274–286.
7. Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Whelan, J., and Millar, A. H. (2003) Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* **132,** 230–242.
8. Giegé, P., Sweetlove, L. J., and Leaver, C. (2003) Identification of mitochondrial protein complexes in *Arabidopsis* using two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **21,** 133–144.

9. Sabar, M., Gagliardi, D., Balk. J., and Leaver, C. J. (2003) ORFB is a subunit of F(1)F(O)-ATP synthase: insight into the basis of cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO Rep.* **4,** 1–6.
10. Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J., and Braun, H. P. (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory chain complexes I and III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102,** 3225–3229.
11. Kügler, M., Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gelelectrophoresis. *Photosynthesis Res.* **53,** 35–44.
12. Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J. M., Krause, F., Dencher, N. A., and Seelert, H. (2003) Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome. *Electrophoresis* **24,** 2814–2823.
13. Ossenbühl, F., Gohre, V., Meurer, J., Krieger-Liszkay, A., Rochaix, J. D., and Eichacker, L. A. (2004) Efficient assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* requires Alb3.1p, a homolog of *Arabidopsis* ALBINO3. *Plant Cell* **16,** 1790–1800.
14. Heinemeyer, J., Eubel, H., Wehmhöner, D., Jänsch, L., and Braun, H. P. (2004) Proteomic approach to characterize the supramolecular organization of photosystems in higher plants. *Phytochemistry* **65,** 1683–1692.
15. Ciambella, C., Roepstorff, P., Aro, E. M., and Zolla, L. (2005) A proteomic approach for investigation of photosynthetic apparatus in plants. *Proteomics* **5,** 746–757.
16. Kjell, J., Rasmusson, A. G., Larsson, H., and Widell, S. (2004) Protein complexes of the plant plasma membrane resolved by blue native PAGE. *Physiol. Plant* **121,** 546–555.
17. Rivas, S., Romeis, T., and Jones, J. D. (2002) The Cf-9 disease resistance protein is present in an approximately 420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* **14,** 689–702.
18. Piotrowski, M., Janowitz, T., and Kneifel, H. (2003) Plant C-N hydrolases and the identification of a plant N-carbamoylputrescine amidohydrolase involved in polyamine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **278,** 1708–1712.
19. Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P., and Binarova, P. (2003) Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell* **15,** 465–480.
20. Salomon, M., Lempert, U., and Rüdiger, W. (2004) Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett.* **572,** 8–10.
21. Boldt, A., Fortunato, D., Conti, A., et al. (2005) Analysis of the composition of an immunoglobulin E reactive high molecular weight protein complex of peanut extract containing Ara h 1 and Ara h 3/4. *Proteomics* **5,** 675–686.
22. Werhahn, W. H., Niemeyer, A., Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K., and Braun, H. P. (2001) Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis thaliana*: identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol.* **125,** 943–954.
23. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,** 265–275.
24. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.
25. Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacry-

lamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166,** 368–379.
26. Neuhoff, V., Stamm, R., and Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Electrophoresis* **6,** 427–448.
27. Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W., and Taube, D. (1990) Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with Coomassie Brilliant Blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11,** 101–117.
28. Henderson, N. S., Nijtmans, L. G., Lindsay, J. G., Lamantea, E., Zeviani, M., and Holt, I. J. (2000) Separation of intact pyruvate dehydrogenase complex using blue native agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* **21,** 2925–2931.
29. Werhahn, W. and Braun, H. P. (2002) Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **23,** 640–646.
30. Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chain of yeasts and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19,** 1777–1783.

第 27 章　完整蛋白质从 SDS-PAGE 胶中的电洗脱及其 MALDI-TOF MS 分析

Zhentian Lei，Ajith Anand，Kirankumar S. Mysore，Lloyd W. Sumner

摘要　已有一种方法可用来从 SDS-PAGE 凝胶中提取完整蛋白质并对其进行 MALDI-TOF MS 分析，以确定其分子质量。这种方法包括一个电洗脱步骤以及在 MALDI-TOF 质谱分析之前的一个低温基质/分析物共结晶步骤。首先用电洗脱方法（ProteoPLUS™）从聚丙烯酰胺凝胶中提取蛋白质。电洗脱之后，在相同的电洗脱管中，透析去除盐、SDS 和染料。真空离心浓缩蛋白质。以牛血清白蛋白（BSA）和磷酸酶 B（Phos B）做标准蛋白，结果发现，电洗脱比被动洗脱能更有效地从凝胶中提取完整蛋白质。优化后的蛋白质回收效率分别为：BSA89％和 Phos B58％。此结果支持了回收效率与蛋白质大小负相关的假设。传统使用甲醇和乙酸“固定胶”的方法被认为会显著降低蛋白质回收效率，如果可能应避免这么做。下一步包括全蛋白与 MALDI 基质（反 3，5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸，芥子酸，10mg/ml）低温共结晶的样品制备过程中也要进一步去除杂质。蛋白质和 MALDI 基质经混合、密封后贮存于 4℃过夜共结晶。然后除去上清液，再用相同的基质溶液溶解蛋白质-基质结晶。用低温共结晶方法得到的 MALDI-TOF MS 信号强度较高，比通用的基质-分析物混合及“干滴”沉淀后的快速分析方法得到的相应信号强 3～4 倍。这里介绍的方法以两种源自小麦非原质体提取物的 β-1，3-内切葡聚糖酶异形体为例。

关键词　完整蛋白质；回收；SDS-PAGE；MALDI-TOF MS；电洗脱；蛋白质组学；共结晶

27.1　前　　言

基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）已经被广泛应用于生物科学中。结合十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）和酶解消化，它提供了一种通过肽质量指纹谱（PMF）的快速、灵敏和准确鉴定蛋白质的方法[1,2]。通常 PMF 给出 10％～40％的序列覆盖率。这样的覆盖率对于蛋白质鉴定来说已经足够，但它可能还不足以用来区分高度相似的蛋白质异构体。蛋白质异构体/同工酶广泛存在，它们通过 mRNA 的可变剪切或多基因家族生成。虽然它们在细胞中催化相同的反应，但是它们常常在不同的组织或生理条件下被差异表达。利用 PMF 区分蛋白质异构体有一定难度，因为能够区分不同异构体的特异性肽段可能无法从 10％～40％的肽段覆盖中找到。由于许多要研究的物种尚缺乏完整基因组、mRNA 和（或）蛋白质序列，导

致通过 PMF 区分异构体的工作更加复杂。

完整蛋白质分子质量的精确测定能为区分异构体提供额外的信息。实验证明，用 SDS-PAGE 鉴定完整蛋白质分子质量的精确度很低（约 10%的误差），而且被测蛋白质和标准分子质量蛋白质之间的结构差异以及翻译后修饰导致修饰后的蛋白质在凝胶电泳时的不正常的迁移，使这种测定方法更加复杂。然而，现代的 MS 技术可提供很高的分子质量精确度（0.1%或更小的误差），是精确测定完整蛋白质分子质量的必选方法。

要精确测定由 SDS-PAGE 分离的完整蛋白质的分子质量，在很大程度上依赖于 SDS-PAGE 凝胶中蛋白质的提取。从凝胶中回收蛋白质要比回收胶内酶解后得到的肽段困难得多，几种从凝胶中提取完整蛋白质的方法已经报道了，大致分为三类：被动洗脱[3-5]，电洗脱[6-8]和电转移（或电印迹）到膜上[9-12]。

Cohen 及其合作者[3]建立了一种利用非固定负染（Cu 或 Zn 染色）和有机溶剂提取蛋白质的被动洗脱技术。脱色后，蛋白质条带被从胶上切下，粉碎，并在提取液［方法 A，蚁酸/水/异丙醇，3∶2∶1（*V/V/V*）］或 MALDI 基质溶液［方法 B，如 4-羟基-α-氰基肉桂酸溶液（4HCCA）］中剧烈振荡几个小时。利用这种技术能够提取分子质量在 70kDa 以下的蛋白质。这种技术成功的关键是使用了非固定金属负染色。这样可以避免胶内蛋白质沉淀，从而获得更好的蛋白质回收效果。不幸的是，负染色相对较贵，考马斯亮蓝染色是一种廉价蛋白质染料，被广泛用于许多实验室。因此，一种从经考马斯亮蓝染色后的凝胶中提取蛋白质的方法会是经济实惠的。

Ehring 及其合作者[4]报道了一种从经考马斯亮蓝染色后的凝胶中提取蛋白质的被动洗脱方法。他们用蚁酸/乙腈/异丙醇/水［50∶25∶15∶10（*V/V/V/V*）］代替蚁酸/水/异丙醇。加入乙腈被认为用来提高对疏水蛋白质的洗脱效果。这种方法虽然操作简单，但只能从经考马斯亮蓝染色后的凝胶中回收分子质量小于 30 kDa 的蛋白质。此外，暴露在蚁酸中过长的时间会引起丝氨酸和苏氨酸残基的甲酰化[4]。为解决这个问题，Claverol 及其合作者报道了一种使用 SDS/乙酸钠缓冲液从考马斯亮蓝染色的凝胶中提取蛋白质的方法，将蛋白质条带浸泡在这个提取缓冲液中 37℃过夜，使蛋白质扩散到缓冲液中，用亲水吸头（$\text{Ziptip}_{\text{HPL}}$，Millipore，Bedford，MA）去除考马斯亮蓝、SDS 和盐分。报道说这种方法可以回收分子质量在 45kDa 以下的蛋白质，但用此方法回收更大的蛋白质仍然很困难。

将丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电转移（或电印迹）至膜上，如硝化纤维（NC）或聚合体膜，是另一种回收完整蛋白质的方法。大部分膜与 MALDI-TOF MS 兼容，允许电印迹后直接分析完整蛋白质。对几种市售膜的系统研究显示用聚偏氟乙烯（PVDF）和聚丙烯（PP）膜能获得最好的结果。但是，使用 UV-MALDI-TOF MS 时，光谱重复性差，信噪比（S/N）低，而且分辨率低。过低的 S/N 比被认为与通常在 MALDI-TOF MS 中使用的紫外激光（355nm）的较浅的有效穿透深度（通常 200～300nm）有关。同时，蛋白质较牢地吸附在膜上也降低解吸附。使用 2.94μm 的红外（IR）激光进行 MALDI-TOF MS 被证明效果较好。红外激光的有效穿透深度在 3～5μm，因此能从 135μm 厚度的膜上解吸附许多蛋白质。

然而，仍然需要指出的是："还需要较大地提高 IR-MALDI-TOF MS 谱的质量，特别是在影响分子质量测定精度的蛋白质信号峰宽方面"[12]。直接将膜印迹的蛋白质溶解在基质溶液中的方法也已有报道[10,11]。通常用可溶解硝化纤维膜（NC）的丙酮制备基质溶液，基质-蛋白质溶液被点在样品板上用于 MALDI-TOF MS 分析，获得更好的可靠性和重复性。但是，相对于那些包含洗脱和纯化蛋白质步骤的方法而言，此方法得到的蛋白质分辨率和精确度较低[11]。据推测，靶中含有的硝化纤维或蛋白质与硝化纤维的相互作用可能导致了分子质量精确度的降低。

用不同电压进行电洗脱提供了一种从 1D 或 2D 聚丙烯酰胺凝胶中提取蛋白质的快速和便捷的方法。实际上，电洗脱是电泳的延续，将蛋白质从凝胶中迁移到溶液中，接着盐、染料和 SDS 经过透析从电洗脱后的溶液中除去，然后浓缩纯化的蛋白质溶液。由于使用了不同的电压，蛋白质主动迁移而不是被动地扩散出凝胶，所以效率更高，特别是用于洗脱大分子质量蛋白质时。已有几种不同的电洗脱方法报道，Clarke 等[6]报道了一种一步微量电洗脱方法。Buzas 等[13]建立了一种直接垂直电洗脱方法，此方法不需要从凝胶上切取蛋白质条带。

这些方法可获得很好的蛋白质回收率（最高达 90%），但需要一些不易获得的特殊设备。Galvani 和他的同事[14]报道了使用市售电洗脱仪，Centrilutor（Amicon，Beverly，MA），提取蛋白质的方法。蛋白质首先被洗脱进 Centricon 旋转过滤器中，然后通过离心除去盐、染料和 SDS，并浓缩蛋白质。将此方法与超声波辅助被动洗脱方法相比较显示，电洗脱可回收高分子质量蛋白质，如牛血清白蛋白（BSA）和磷酸酶 B，而被动洗脱无法提取到足够量的此类蛋白质供 MALDI-TOF MS 分析。但是，作者也指出，在检测小分子质量蛋白质时，被动洗脱可获得比电洗脱更好的质谱数据。这可能是由于电洗脱未能彻底地除去电泳缓冲液中的 SDS、染料和盐分。的确，在我们的实验中，经过过夜透析后的浓缩蛋白质样品中还可看到明显的蓝色，这说明那些成分去除不完全的可能性。

在此，我们介绍用另一种市售电洗脱仪（ProteoPLUS™）来回收凝胶上的蛋白质，然后经过一个低温蛋白质/基质共结晶步骤，进一步去除残留的杂质以增强 MALDI-TOF MS 信号。首先将蛋白质从凝胶中提取出来，在相同的电洗脱管中透析过夜，然后真空离心（SpeedVac）浓缩。以牛血清白蛋白（BSA）和磷酸酶 B（Phos B）为标准样品，发现这种方法比被动洗脱的效果好。当凝胶上样量为 5μg 时，回收效率分别为：BSA 89%和 Phos B 58%。被动洗脱（将捻碎的蛋白质条带浸泡在 1×电泳缓冲液过夜）无法回收到磷酸酶 B，并且只能回收加样的 BSA 的 39%（表 27-1）。在进行 MALDI-TOF MS 之前，将浓缩蛋白质与基质共结晶，进一步去除残留杂质。混合蛋白质溶液和基质溶液［芥子酸，10mg/mL 溶于乙腈/水（3∶7）］，置于 4℃过夜，基质在低温下的低溶解度导致蛋白质和基质的共结晶。丢弃含盐和染料的上清液，用相同的基质溶液回收晶体。

表 27-1 蛋白质回收的比较[a]

蛋白质	电洗脱/%		被动洗脱/%	
	固定	非固定	固定	非固定
磷酸酶 B	6	58	未检出	未检出
牛血清白蛋白	66	89	未检出	39

a 固定表示用甲醇和乙酸固定液固定 SDS-PAGE 蛋白质；非固定表示不使用固定液；未检出表示在考马斯亮蓝染色条件下未检出；凝胶加样量：5μl。数据显示增加的回收率与固定和电洗脱无关，蛋白质的回收率与蛋白质分子质量成反比，如蛋白质分子质量增加，回收率就降低。

本实验方法用于分析由转基因小麦非原质体提取物中纯化得到的两种 β-1，3-内切葡聚糖酶异构体[15]。如图 27-1 所示，共结晶后 MALDI-TOF MS 的信号得到了显著的增强。例如，β-1，3-内切葡聚糖酶异构体 1（G1）的 MALDI-TOF MS 信号增强了 3 倍，而 β-1，3-内切葡聚糖酶异形体 2（G2）的 MALDI-TOF MS 信号增强 7 倍。这个结果证明蛋白质和基质在低温（4℃）下共结晶去除残留的盐、去垢剂和考马斯亮蓝染料，可有效地增强 MALDI-TOF MS 信号。

27.2 材　　料

（1）1× 电泳缓冲液：25mmol/L Tris-HCl，192mmol/L 甘氨酸，0.1%（*m*/*V*）SDS，pH 8.3 [用 10×TGS（Tris/甘氨酸/SDS）电泳缓冲液（Bio-Rad，产品目录号：161-0772）稀释配制]。

（2）水平凝胶电泳仪（Horizon 58，Life Technologies，NY）。

（3）电洗脱试剂盒（ProteoPLUS，产品目录号：Prot0015，Qbiogene，Irvine，CA）。

（4）蛋白质染色液（ElectroBlue™，产品目录号：Probs500，Qbiogene）。

（5）真空离心浓缩仪（SpeedVac）。

（6）1.5ml 微量离心管。

（7）150μl 微量离心管。

（8）芥子酸（反-3，5-二甲氧基-4-羟基肉桂酸）溶液：以 10mg/ml 溶于含 69%水、30%乙腈和 1%蚁酸的溶液中。

（9）Milli-Q 水或相应的高纯度蒸馏/去离子水。

27.3 方　　法

27.3.1 蛋白质检测

一般而言，凝胶染色和脱色非常易于操作。在本实验方法中，我们使用 ElectroBlue 染料代替有固定作用的考马斯亮蓝染色液显色蛋白质（见注释 1）。

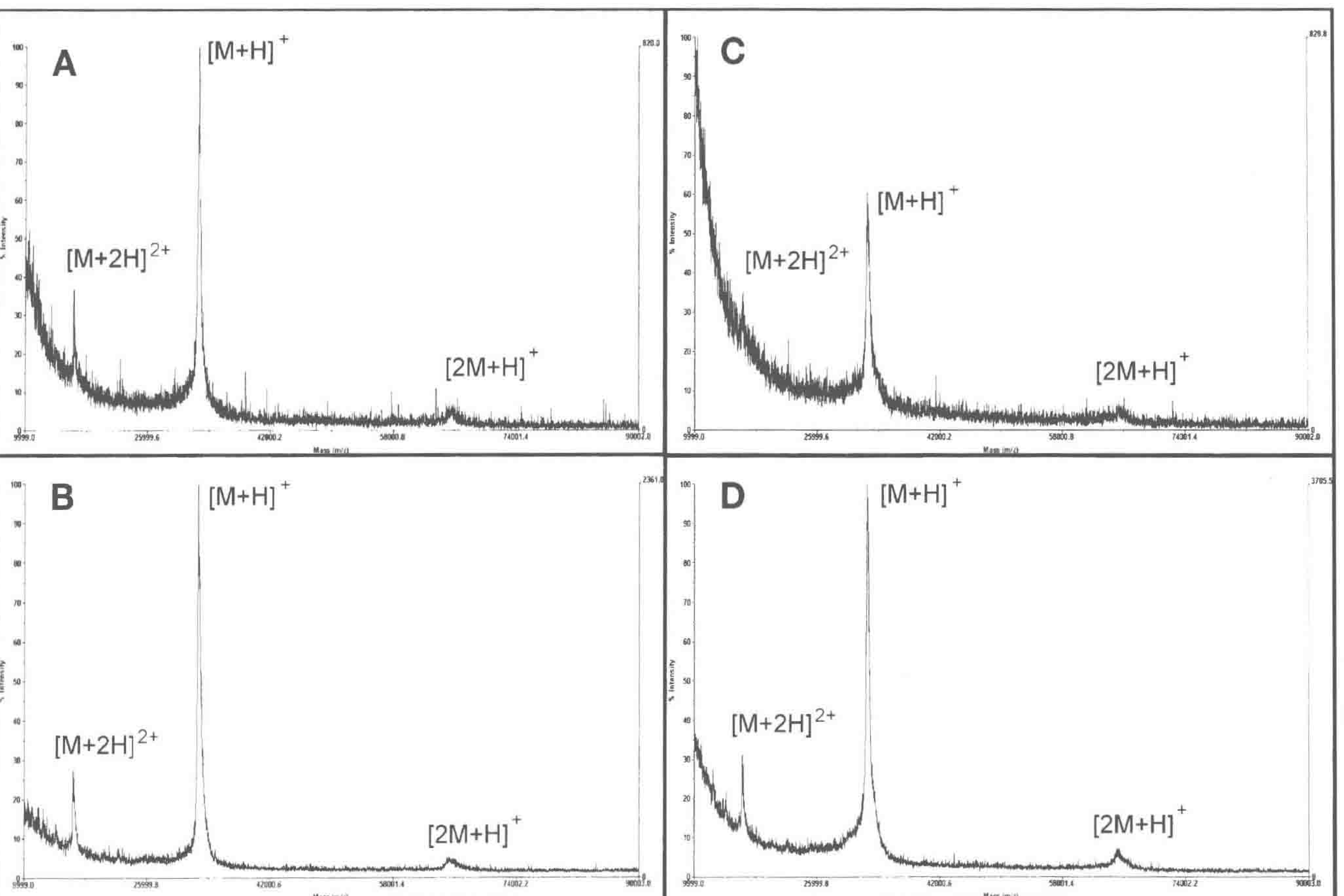


图 27-1　从 SDS-PAGE 洗脱出来的两个 β-1，3-内切糖苷酶异构体的 MALDI-TOF 质谱图

A. 未与基质共结晶的 β-1，3-内切糖苷酶异构体 1（G1，分子质量 32 620 质谱图）。B. 与基质共结晶的 G1 质谱图。C. 未与基质共结晶的 β-1,3-内切糖苷酶异构体 2（G2，分子质量 32 541 质谱图）。D. 与基质共结晶的 G2 质谱图。这两个蛋白质是从小麦非原质体纯化获得的

(1) SDS-PAGE 电泳后，用 300ml Milli-Q 水或去离子水漂洗凝胶（8cm×10cm）3 次，每次 10min。

(2) 用 ElectroBlue 染料给凝胶染色，用大约 20ml 染色液浸泡凝胶（8cm×10cm），缓慢摇动 2h（见注释 3）。

(3) 用 300mL Milli-Q 水或去离子水漂洗凝胶脱色，直至达到所需的凝胶背景。每 30min 换一次水。

27.3.2　电洗脱

(1) 将电洗脱管垂直向上放置，加入 0.8ml Milli-Q 水或去离子水，盖上盖。等待 10min 并检查是否漏液。倒空管内液体（见注释 4）。

(2) 用一个干净，锋利的直刃剃刀将蛋白质条带从染色的凝胶上切下来，用一字镊子将凝胶碎片转移至电洗脱管中，在管中加入 1×电泳缓冲液（0.8ml），轻轻盖上盖，小心地将管安放在电洗脱仪的支持盘上，这样电流就可以直接通过两个薄膜窗（见注释 5）。

(3) 向电泳槽内灌入 1×电泳缓冲液并将电洗脱支持盘放入槽内，确保电洗脱管完全浸泡在电泳缓冲液中，而且每根管的薄膜与电场垂直。

(4) 120V 电泳 2h（见注释 6）。

(5) 电泳结束后，翻转正负极，并在相同电压下电泳 30～60s（见注释 7）。

(6) 用镊子将凝胶碎片从电洗脱管中取出。轻轻盖上盖，将管子放回支持盘中。

(7) 将支持盘放入盛有所需缓冲液或酸化水（1%蚁酸）的 2L 烧杯中。4℃过夜透析，期间更换一次缓冲液。

(8) 透析完成后，将蛋白质溶液转移至 1.5mL 微量离心管中，用真空离心浓缩仪（SpeedVac）浓缩至 5μL 左右（见注释 8）。

(9) 将浓缩后的蛋白质溶液（1μl）与基质溶液（1μl，芥子酸，10mg/ml 溶于 30%乙腈）混合在 150μl 微量离心管中，盖紧盖后 4℃放置过夜，让蛋白质和基质共结晶（见注释 9）。

(10) 轻轻打开微量离心管盖并用 2μl 移液器除去上清液。向管中加入 1μl 基质溶液以重悬晶体，涡旋振荡，然后将其点样在 MALDI 样品板上（见注释 10）。

27.4　注　　释

(1) 固定蛋白质或在有固定作用的溶液（主要是甲醇和乙酸的混合物）中给凝胶染色是用 SDS-PAGE 分析蛋白质的常用步骤。乙酸和甲醇的混合物会导致几乎所有的蛋白质沉淀在胶上，从而防止蛋白质在染色过程中扩散流失。然而，这样做会显著地降低电洗脱过程中的蛋白质产率（表 27-2 和图 27-2）。以 BSA 为例，我们发现其产率降低了 30%。固定处理导致的产率损失似乎对大分子质量蛋白质的作用更剧烈。对于磷酸酶 B 来说，当凝胶经过固定后蛋白质回收率下降了 89%。因此，去掉固定凝胶步骤对于从 SDS-PAGE 凝胶中回收的完整蛋白质有益。如果可能，应使用非固定的考马斯亮

蓝染色。已有一些市售的基于考马斯亮蓝的胶体染色液，它们具有很好的灵敏度，而且对蛋白质没有或仅有很少的固定作用。这些染色液包括 Qbiogen 公司生产的 Electro-Blue 染色液（产品目录号：PROBS500）和 Fermentas 公司生产的 PageBlue™ 染色液（产品目录号：R0571）。PageBlue 不含像甲醇或乙酸这样的固定剂，它是从凝胶中回收蛋白质的理想选择。Electro-Blue 染色液对凝胶中的蛋白质有轻微的固定作用，它也适用于从凝胶中洗脱完整蛋白质。

表 27-2

蛋白质/kDa	时间/min
14	35～45
22	45～55
50	75～85
66	85～95
29	55～65
40	60～70
45	65～75
81	105～115
116	120～130
128	140～150

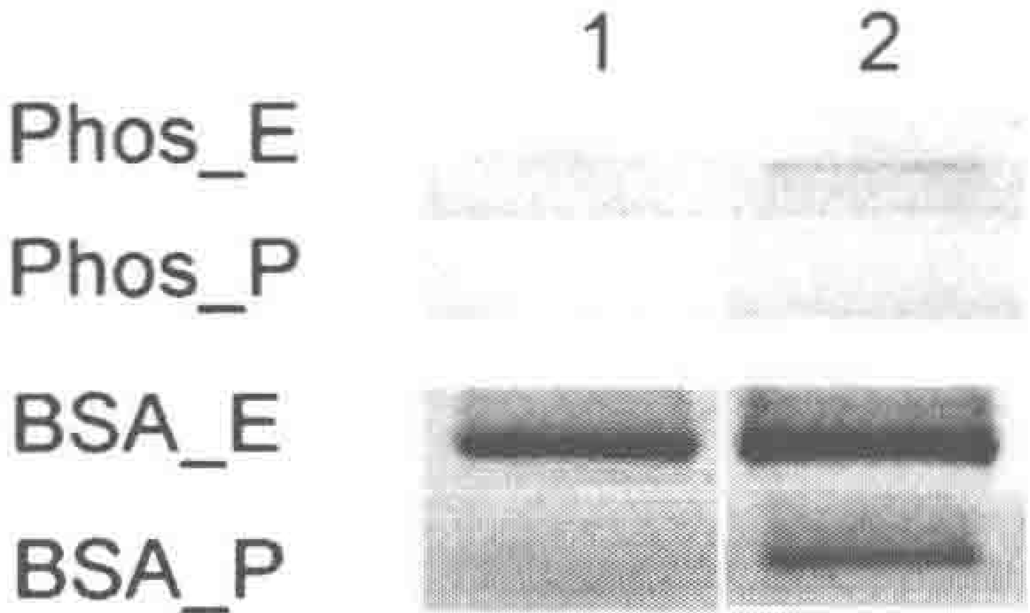


图 27-2　用甲醇/乙酸固定（泳道 1）和非固定（泳道 2）的 Phos B 和 BSA 在 10.20%凝胶上的 SDS-PAGE 电泳分析，上样量为 5μl。Phos _ E/BSA _ E 表示通过电洗脱回收的蛋白质；Phos _ P/BSA _ P 表示通过被动洗脱回收的蛋白质

（2）要彻底漂洗凝胶，这是因为 SDS 会干扰染色过程。

（3）确保凝胶完全浸入染色液中。根据不同凝胶尺寸调整染色液体积。凝胶过夜染色不会导致其背景加深。

（4）在整个实验过程中，千万不要用手，吸管或镊子接触电洗脱薄膜。

（5）在从凝胶上切取蛋白质条带时，小心操作，不要弄碎条带。注意，一个电洗脱管中只放一块凝胶。一个电洗脱管中放入一块以上的凝胶会降低回收率，这是因为从一个胶块中洗脱下来的蛋白质可能进入另一个胶块。如果一个条带碎成了几块，则每块胶使用一个样品管。或者用 4%琼脂糖（400mg 琼脂糖溶解在 10ml 1×电泳缓冲液中）将胶块封在一起。

（6）洗脱时间依赖于蛋白质大小、胶块大小、所加的电压、聚丙烯酰胺凝胶浓度和固定方法。实验人员需要确定每种蛋白质的最佳洗脱时间。作为参考，以下给出了在 100V 电压下，从 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶（聚丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺，29∶1）中洗脱出不同大小的蛋白质所需的最短时间（引自 Qbiogen）（表 27-2）。

（7）电洗脱后，强烈建议将正负极翻转后再进行 30～60s 电泳。这样可以使电洗脱/电泳过程中附着在电洗脱管薄膜上的蛋白质释放到电泳缓冲液中。通常这样会提高蛋白质产率，尤其在蛋白质上样量相对较低时。

（8）不要让样品完全干燥，完全干燥后的蛋白质很难复溶。经常检查样品，尤其是样品快干时。

（9）基质溶液配制方法：在含有 1ml 乙腈和水混合物［CAN/H_2O，3∶7（V/V）］

的 1.5ml 微量离心管中加入 10mg 芥子酸。在水浴中超声波处理 10min，50℃加热 30min。将基质溶液（1μl）加入含有 1μl 回收得到的蛋白质的 150μl 微量离心管中，用吸管头反复吹打混合，然后用同一个吸管头刮擦微量离心管的内壁和底部数次，刮擦会引发晶体生长。

（10）蛋白质和基质过夜共结晶后，小心拿住离心管。保持低温条件，用 2μl 吸头小心地除去上清液。不要用吸头摇动，吹滴或接触内壁。

致谢

感谢堪萨斯州立大学生物化学系的 Subbaratnam Muthukrishnan 博士提供小麦非原质体提取物。本研究由 Samuel Roberts 诺贝尔基金支助。

参 考 文 献

1. Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422,** 198–207.
2. Newton, R. P., Brenton, A. G., Smith, C. J., and Dudley, E. (2004) Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* **65,** 1449–1485.
3. Cohen, S. L. and Chait, B. T. (1997) Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* **247,** 257–267.
4. Ehring, H., Stromberg, S., Tjernberg, A., and Noren, B. (1997) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins extracted directly from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11,** 1867–1873.
5. Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Gairin, J. E., and Monsarrat, B. (2003) Characterization of protein variants and post-translational modifications: ESI-MSn analyses of intact proteins eluted from polyacrylamide gels. *Mol. Cell. Proteomics* **2,** 483–493.
6. Clarke, N. J., Li, F., Tomlinson, A. J., and Naylor, S. (1998) One step microelectroelution concentration method for efficient coupling of sodium dodecylsulfate gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for protein analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **9,** 88–91.
7. Jacobs, E. and Clad, A. (1986) Electroelution of fixed and stained membrane proteins from preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels into a membrane trap. *Anal. Biochem.* **154,** 583–589.
8. Schuhmacher, M., Glocker, M. O., Wunderlin, M., and Przybylski, M. (1996) Direct isolation of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and analysis by electrospray-ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **17,** 848–854.
9. Schleuder, D., Hillenkamp, F., and Strupat, K. (1999) IR-MALDI-mass analysis of electroblotted proteins directly from the membrane: comparison of different membranes, application to on-membrane digestion, and protein identification by database searching. *Anal. Chem.* **71,** 3238–3247.
10. Liang, X., Bai, J., Liu, Y. H., and Lubman, D. M. (1996) Characterization of SDS–PAGE-separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **68,** 1012–1018.

11. Dukan, S., Turlin, E., Biville, F., et al. (1998) Coupling 2D SDS-PAGE with CNBr cleavage and MALDI-TOFMS: a strategy applied to the identification of proteins induced by a hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* **70,** 4433–4440.
12. Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F., Eckerskorn, C., and Lottspeich, F. (1994) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins electroblotted after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Chem.* **66,** 464–470.
13. Buzas, Z., Chang, H. T., Vieira, N. E., Yergey, A. L., Stastna, M., and Chrambach, A. (2001) Direct vertical electroelution of protein from a PhastSystem band for mass spectrometric identification at the level of a few picomoles. *Proteomics* **1,** 691–698.
14. Galvani, M., Bordini, E., Piubelli, C., and Hamdan, M. (2000) Effect of experimental conditions on the analysis of sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis separated proteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14,** 18–25.
15. Anand, A., Lei, Z., Sumner, L. W., et al. (2004) Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Mol. Plant Microbe. Interact.* **17,** 1306–1317.

第 28 章　植物蛋白芯片的构建和抗原-抗体相互作用的研究

Birgit Kersten 和 Tanja Feilner

摘要　拟南芥和水稻基因组测序项目的完成极大地支持了蛋白质组学方法的应用，如蛋白质芯片技术。在本章中，我们介绍一种植物蛋白质芯片的构建方法及其在单克隆抗体或多克隆血清的特异性和交叉反应研究方面的应用。此方法从已鉴定的编码携带 His 标签的植物蛋白质的大肠杆菌（*E. coli*）cDNA 表达克隆开始，用高通量技术表达和纯化这些重组蛋白质后，用接触点样机构建蛋白芯片。用一种抗 RGS-His_6 抗体来检测芯片上的这些重组蛋白质，为了分析特异性抗体，首先将芯片浸泡在各自的抗体溶液中孵育，接着在带荧光标记的第二抗体溶液中孵育。用芯片扫描仪检测信号。包含植物全蛋白质组的蛋白质芯片将是未来用以检测抗体的特异性和交叉反应的理想芯片格式。

关键词　蛋白质芯片；抗体和血清谱；互作研究；拟南芥；高通量；蛋白质组学

28.1　前　　言

蛋白质芯片包含几百甚至几千个已知的蛋白样品，这些蛋白样品有序、高密度排列在镀膜玻璃板上[1-4]。利用这些蛋白质芯片可以对蛋白质的表达[5-7]和修饰[8-11]进行平行、快速和简易的分析，同时也可以用来检测这些蛋白质与抗体[12-15]、其他蛋白[16,17]、DNA[18,19]或其他小分子[20,21]之间的相互作用。已有一些研究工作使用蛋白质抗原芯片分析特异性抗体[12,15]或从患有不同疾病的病人中筛选血清[15,22,23]。蛋白质组芯片作为一种理想的分析特异性抗体的格式被人们所重视[13]。为了在单个蛋白质芯片上分析几种不同的抗体，可能需要运用不同的方法[24,25]。与 Western 印迹相比，运用蛋白质芯片分析抗体有一些优点[13]，其中包括高灵敏度的蛋白质检测[13,23]。

蛋白质组学方法，如 2D 电泳/质谱（2-DE/MS）方法或是蛋白质芯片技术，在植物学领域中的应用越来越多[26-32]。在此，我们介绍一种构建植物蛋白质芯片以及利用蛋白质芯片研究抗原抗体相互作用的方法。我们已成功地运用此方法构建了包含 96 个拟南芥蛋白质的第一个植物蛋白质芯片，当每个点的蛋白质最少含有 2～4 fmol 时，用 FAST™点样片基上的抗 RGS-His_6 抗体就能检测出这些蛋白质[14]。利用这些蛋白质芯片，我们能显示单克隆抗 TCP 抗体、多克隆抗 MYB6 和抗 DOF11 的血清识别芯片上相对应的抗原，并且不和其他包括 DOF 和 MYB 转录因子在内的固定蛋白交叉反应。

本方法中，我们使用已鉴定的 cDNA 表达克隆，高通量表达和纯化带有 RGS-His6 标签的植物蛋白质，纯化得到的蛋白质自动排列在 FAST 点样片基上。这些蛋白质芯

片与相应的的抗体一起孵育，然后再与带有荧光标记的第二抗体一起孵育。我们可通过检测、分析信号，鉴定那些与被测抗体互作的蛋白质。

28.2 材　　料

28.2.1 高通量蛋白质表达和纯化

（1）细胞培养基：2 份 YT 或 LB 培养基包含 100μg/ml 氨苄青霉素，15μg/ml 卡那霉素和 2%的葡萄糖。

（2）96 孔微量滴定板（Greiner bio-one，Frickenhausn，Germany）。

（3）384 孔微量滴定板（Gentix，Christchurch，UK）。

（4）96 孔深孔板：每孔容积 2ml 的 96 孔微滴定板（Qiagen，Hilden，Germany）。

（5）96 针复制器（Nunc，Wiesbaden，Germany）。

（6）4×SB 培养基：48g/L 胰化蛋白胨，96g/L 酵母提取物，0.8%（*V/V*）甘油，120℃高压灭菌 20min。

（7）20 × PP 缓冲液（磷酸钾盐缓冲液）：17mmol/L KH_2PO_4，72mmol/L KH_2PO_4，用 0.2μm 孔径的滤膜过滤灭菌。

（8）硫胺。

（9）异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG；MBI Fermentas，St. Leon-Rot，Germany）。

（10）$MultiScreen_{HTS}$真空歧管（Millipore，Eschborn，Germany）。

（11）NiNTA 琼脂糖（NTA：氮川三乙酸镍；Qiagen）。

（12）变性裂解缓冲液：100mmol/L NaH_2PO_4，10mmol/LTris-HCl，6mol/L GuHCl，pH8.0。

（13）洗涤缓冲液：100mmol/L NaH_2PO_4，10mmol/LTris-HCl，8mol/L 尿素，pH 6.3。

（14）洗脱缓冲液：100mmol/L NaH_2PO_4，10mmol/LTris-HCl，8mol/L 尿素，pH 4.5（第 12～14 条，见注释 1）。

（15）96 孔微孔过滤板，无蛋白质结合的孔径为 0.65μm 的 PVDF 膜（Millipore Multiscreen MADVN 6550）。

（16）Bradford 试剂（Bio-Rad，Munich，Germany）。

28.2.2 构建植物蛋白质芯片

（1）384 孔微孔板（Genetix）。

（2）FAST 点样基片（Whatman Schleicher & Schuell，Dassel，Germany）。

（3）Q 芯片分析系统（Genetix，New Milton，UK）。

（4）小鼠、大鼠和兔子的免疫球蛋白抗体（Santa Cruz，Biotechnology，Santa Cruz，CA）。

28.2.3　蛋白芯片上的抗体筛选

（1）芯片扫描仪：428 Arrayscanner 扫描仪（Affimetrix，Palo Alto，CA）或 ScanArray4000 扫描仪（Perkinelmer Life Science，Cologne，Germany）。

（2）盖载片（Carl Roth，Karlsruhe，Germany）。

（3）GenePixPro4.0 软件。

1. 在 FAST 点样基片上的单克隆抗体筛选

（1）TBS+Tween-20（TBST）：10mmol/L Tris-HCl，pH7.5，150mmol/L NaCl，0.1%（V/V）Tween-20。

（2）封闭液：2%牛血清蛋白（BSA）（Sigma，St. Louis，MO）溶于 TBST 中。

（3）小鼠抗 RGS-His_6 抗体（Qiagen）。

（4）特异单克隆抗体，如大鼠抗 CP1 抗体（Affinity Bioreagents，Cholden，USA）。

（5）Cy3 标记的配体作为第二抗体，如兔抗小鼠 IgG 配抗 RGS-His_6 一抗，或兔抗大鼠 IgG 配抗 TCP1 一抗（Dianova，Hamburg，Germany）。

2. 在 FAST 点样片基上的多克隆抗体筛选

（1）TBS+Tween-20（TBST）：10mmol/L Tris-HCl，pH7.5，150mmol/L NaCl，0.1%（V/V）Tween-20。

（2）鱼胶（由深海鱼鱼皮制成）（Sigma）。

（3）多克隆大鼠血清，如抗 DOF11 或抗 MYB6 血清（Pineda，Berlin，Germany）。

（4）羊抗兔免疫血清-Cy3 抗体（Dianova，Hamburg，Germany）。

28.3　方　　法

28.3.1　高通量蛋白的表达和纯化

我们用在 pQE30 表达载体里构建的，可表达带 N 端 RGS-His_6 标记的大肠杆菌（*E. coli*）cDNA 表达克隆（在 *E. coli* SCS1/pSE111）[35]来生产重组植物蛋白。由于超出本章节的范围，我们不在此详细叙述这种表达克隆的产生过程，只是简要地概括一下。从下列的 cDNA 表达库中，我们也许能获得以上所述的植物表达克隆：在 *E. coli* 表达载体 pQE30NST（检索号：AF074376）中构建的大麦表达库和在 pQE30NAST attB 载体（检索号：AF386205）中构建的拟南芥表达库。这些表达库已经按照 Konrad Buessow 研究小组的方法，用脱氧胸腺嘧啶脱氧寡核苷酸作引物，生产具有完整 N 端的重组蛋白[34-36]。我们用全长拟南芥克隆作为植物蛋白表达克隆的另一个来源，这个全长拟南芥克隆是通过用基因特异引物限制性依赖克隆，或用 GATEWAY™克隆技术重组依赖性克隆，进行可读框直接克隆获得的。

为了从上述这些资源中高通量和小规模表达植物蛋白质，我们采用如下方法。

蛋白质表达

(1) 在孔体积为 2ml 的 96 孔深孔板上加满附加了 2%葡萄糖，100μg/ml 氨苄青霉素和 15μg/ml 卡那霉素的 100μl 2YT 培养基。

(2) 重组克隆培养物从之前保存在－80℃的 384 或 96 孔微孔板上接种出来，接种时要用 96 针复制器。

(3) 培养物在 37℃剧烈振摇（320r/min）生长 16h 后，加入 900 μl 预先加热的培养基（1×SB 培养基，附加了 100μg/ml 氨苄青霉素，15μg/ml 卡那霉素，20μg/ml 硫胺的 1×PP 缓冲液），然后继续培养 2h。

(4) 为了诱导蛋白质表达，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，并继续培养 4～5h。

(5) 4℃，1 500*g* 离心 10min，收集细胞，沉淀物于－80℃下保存。

(6) 取出一部分收获细胞的裂解产物在 15%的聚丙烯酰胺凝胶上检测蛋白质表达效率（图 28-1）。

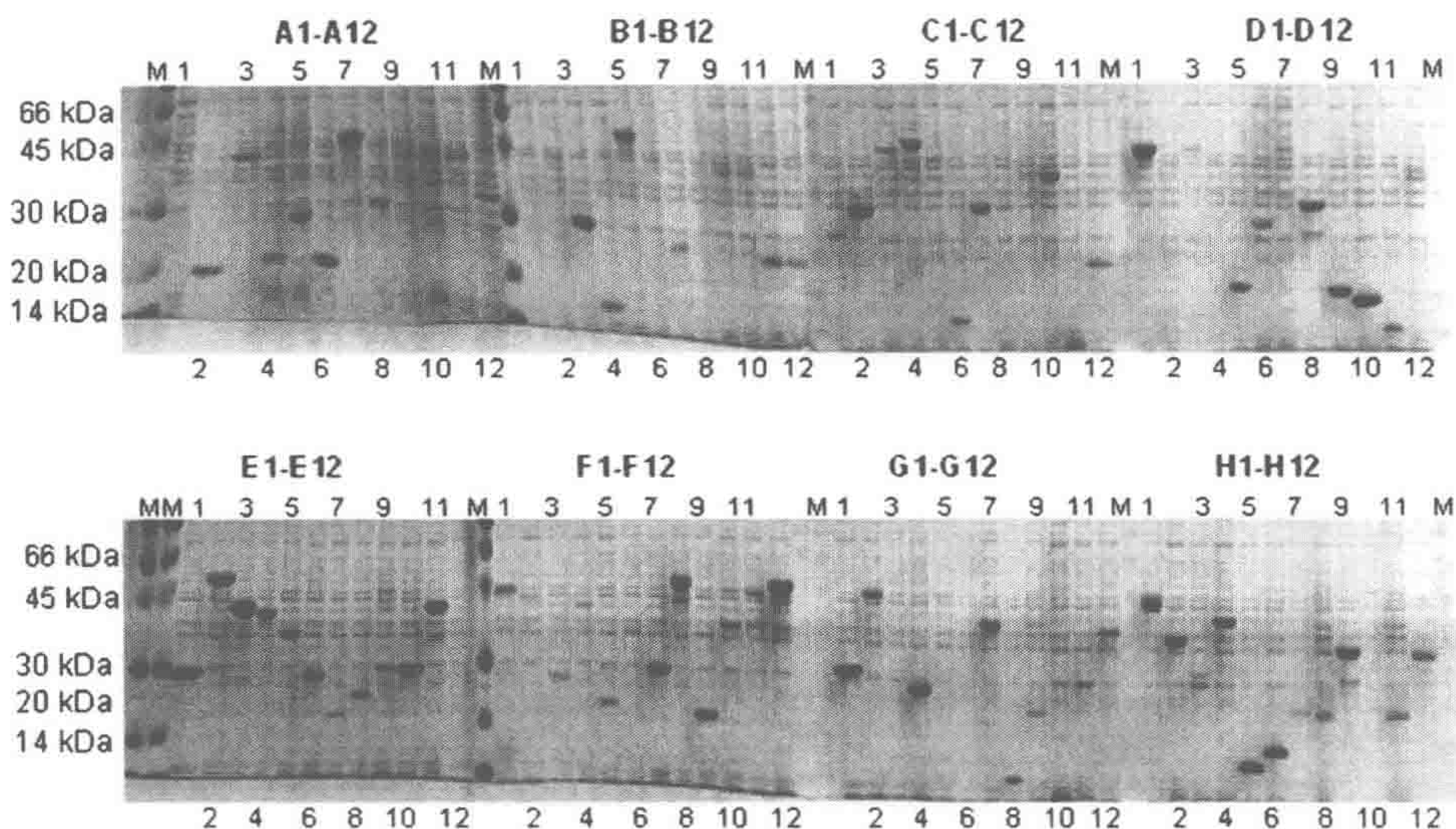


图 28-1　诱导表达后的 96 个拟南芥表达克隆裂解产物的 SDS-PAGE（15%）电泳

表达克隆是从一个拟南芥 cDNA 表达库中获得[33]，裂解产物用 15% SDS-PAGE 分离，并用考马斯染色。A1～H12，96 孔板坐标；M，标准蛋白质；标准蛋白质分子质量以 kDa 为单位显示在左侧

蛋白质纯化

(1) 首先，在解冻的沉淀物中加入 150μl 的变性裂解缓冲液，剧烈涡旋振荡溶解沉淀物，然后室温下振摇（约 650r/min）孵育 30min（见注释 2）。

(2) 1 900*g* 离心裂解细胞。上清液转移到 96 孔滤板上（见注释 3），并且用真空抽滤盒（vacuummanifold）迅速吸入到一新鲜滤板上（见注释 4 和注释 5）。

(3) 接着在每个孔中加入 30μl NiNTA-琼脂糖（1∶2 稀释于裂解液中），用胶带密封，室温下，300r/min 振摇 1h，使组氨酸标记物与蛋白质结合。

（4）用 100μl 的洗涤缓冲液重悬、洗涤琼脂糖微球，振摇 5min，重复 3 次，然后将上清液转移到真空歧管中（见注释 5）。

（5）最后，用 80μl 的洗脱液静止孵育琼脂糖微球 20min，将蛋白质从琼脂糖微球中洗脱出来，洗脱液过滤转移到一个新鲜的 96 孔板上（见注释 6）。

（6）蛋白质在 4℃下保存。

（7）纯化的蛋白质可被分离，如用 15%的聚丙烯酰胺凝胶（图 28-2）。蛋白浓度用 Bradford 蛋白质分析方法确定。

运用上述方法，我们获得了平均浓度约为 100μg/ml 的纯化蛋白质（数据未显示）。

28.3.2 构建植物蛋白质芯片

我们将 FAST 点样片基用作构建植物蛋白质芯片的表面，进行抗体分析或蛋白磷酸化研究[8,33]（见第 29 章）。

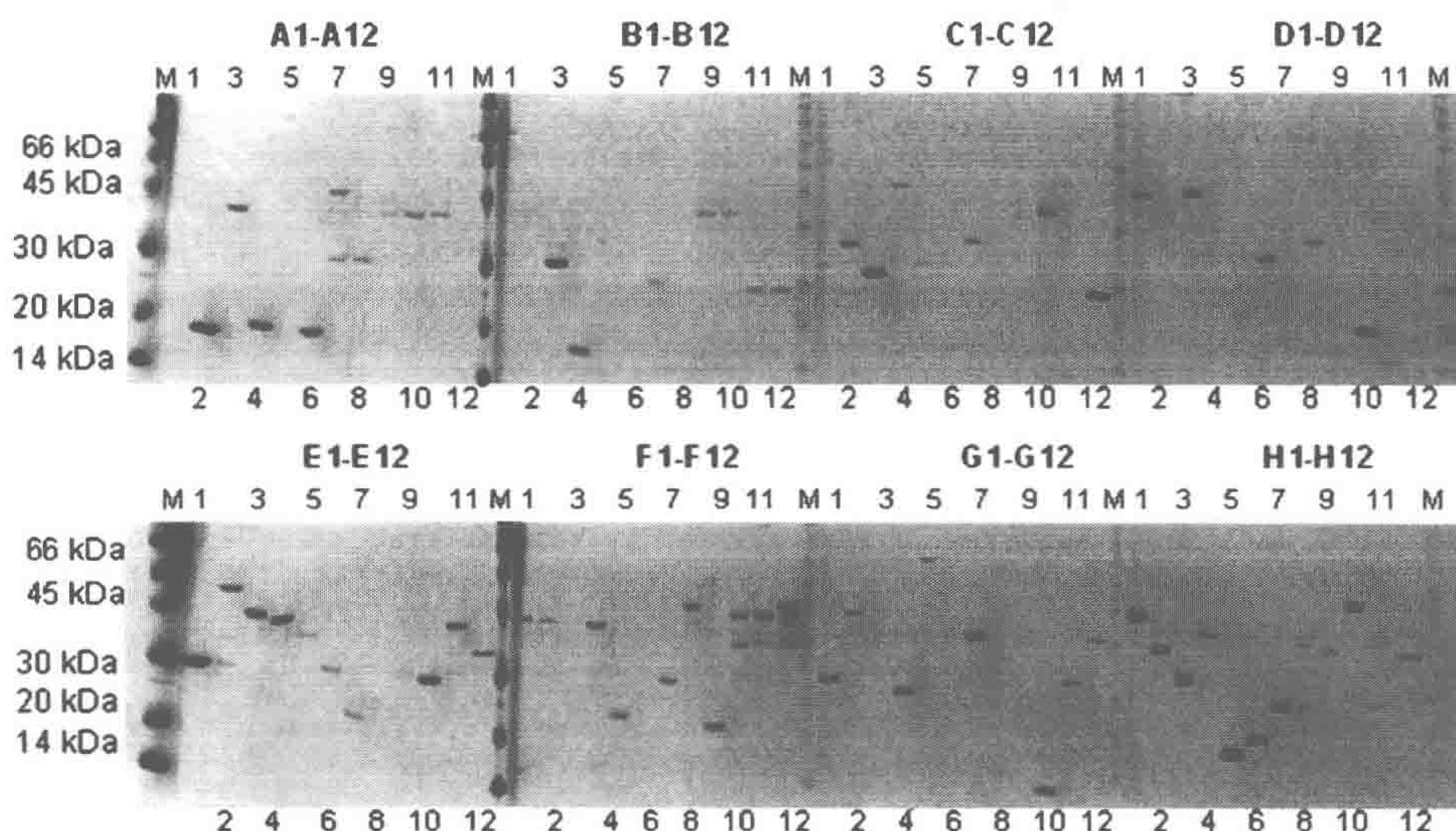


图 28-2 96 个纯化的组氨酸标记拟南芥蛋白质的 SDS-PAGE（15%）电泳

蛋白质从一个拟南芥 cDNA 表达库表达和纯化获得，蛋白质用 15% SDS-PAGE 分离，并用考马斯染色。A1～H12：96 孔板坐标；M：标准蛋白质；标准蛋白质分子质量以 kDa 为单位显示在左侧

（1）在构建芯片之前，先将 20μl 的纯化植物蛋白和对照（见注释 8）转移到 384 孔板上。

（2）FAST 芯片片基放在 QArray 芯片检测系统上，此芯片检测系统带湿度控制器（65%～70%）和 16 个顶端直径为 150μm 的钝头不锈钢，针距为 4.5mm。我们采用 120μm 的点深度。

（3）每个样品上样一次，每个点上样量为 0.6nL[40]。

（4）每一次点样后，点样器要用双蒸水清洗（6s），热风机吹干（2s），再用 80% 的乙醇清洗（6s），再次吹干，防止交叉污染。

（5）蛋白质芯片在密闭的片基盒中，4℃保存。

蛋白质可以不同的模板形式点样，如 4×4、8×8、10×10 等（见注释 9）。同样，蛋白质也可以重复点样，如 2 次，4 次或多次等。研究抗体和抗原之间的相互作用，建议在两个相同的区域在水平方向上点样 2 次（见注释 10）。

用这个方法构建的植物蛋白质芯片可用来进行抗体分析研究，在 4℃保存时至少能在 3 星期内提供可重复的结果。此外，这种植物蛋白质芯片还可用于蛋白激酶磷酸化的研究[8,33]，本书中已有详细的介绍（见第 29 章）。

为了检测固定在蛋白质芯片片基上的重组植物蛋白，按照如下方法（见 28.3.3 节 1）将芯片片基孵育在抗 RGS-His_6 的抗体中。图 28-3 举例说明了一个含有从一个 cDNA 表达文库中表达和纯化获得的 96 个拟南芥蛋白质的芯片[33]，蛋白质以 4×4 模式，在两个相同的区域，水平方向上重复点样，所有的重组蛋白发出一个信号，显示蛋白质表达和纯化效率，同时也说明被转移到芯片上的样品量足以用来检测芯片上的被测重组蛋白质（图 28-3）。

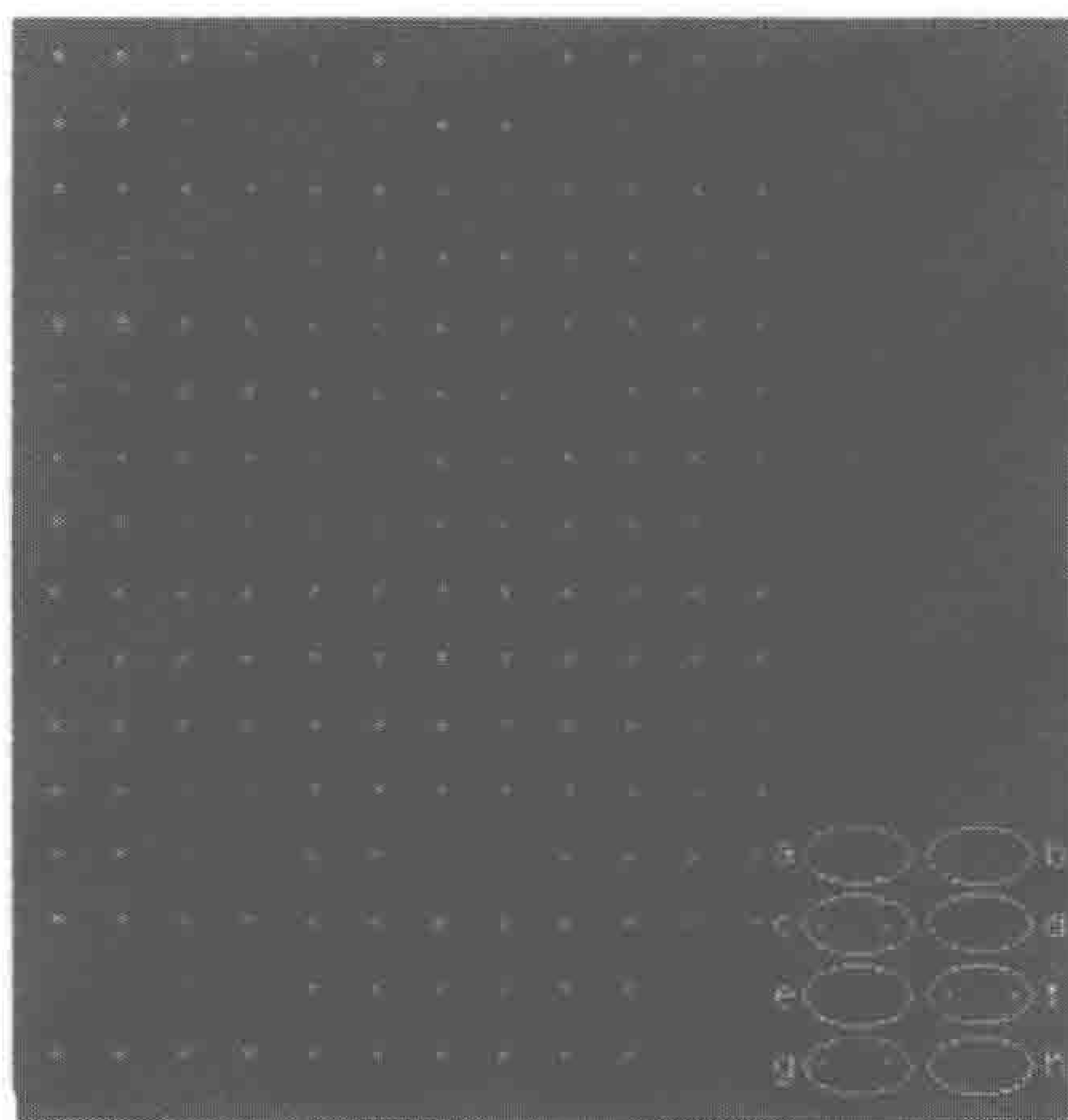


图 28-3　用抗 RGS-His_6 抗体检测 FAST 片基上的 96 个组氨酸标记拟南芥蛋白质

这 96 个蛋白质是从一个拟南芥 cDNA 表达库表达和纯化获得的[33]。这些蛋白质和几个对照（a～h）按照 4×4 模式，水平方向上 2 次重复点样在 FAST 点样片基上，这些蛋白质芯片用抗 RGS-His_6 抗体筛选。对照：a. 洗脱缓冲液；b. PBS；c. 兔抗小鼠 IgG-Cy3 二抗，1∶25 稀释在 PBS 中；d. BSA，溶解在 PBS 中（20 pmol/μl）；e. 正常的兔 IgG，1∶10 稀释在 PBS 中；f. 大鼠 IgG，1∶10 稀释在 PBS 中；g. 小鼠抗 RGS-His_6 抗体，1∶10 溶解在 PBS 中；h. 正常小鼠 IgG，1∶10 稀释在 PBS 中

28.3.3　蛋白芯片上的抗体筛选

1. FAST 点样片基上的单克隆抗体筛选

（1）植物蛋白质芯片在室温下用 2%的 BSA/TBST 封闭处理 1h。

（2）将小鼠抗 RGS-His_6（1∶2000 稀释）或植物特异抗体（如大鼠抗 TCP1 抗体；1∶1000 稀释）稀释在封闭液中（见注释 11）。

（3）用 TBST 冲洗 2 次，每次 10min。

（4）将芯片片基与相应的 Cy3 标记的第二抗体（兔抗小鼠 IgG 配抗 RGSHis$_6$ 一

抗；兔子抗大鼠 IgG 配抗 TCP1 抗体）室温下孵育 1h，这些二抗以 1∶800 的比例稀释在封闭液中（见注释 13 和注释 14）。

(5) 用 TBST 冲洗 3 次，每次 30min（见注释 15）。

(6) 在扫描之前，我们用微孔板离心机甩干芯片（Eppendorf，Hamburg，Germany，产品目录号：5810R）或人工吹干。

(7) 用 428Arrayscanner 扫描仪或 ScanArray 4000 扫描仪检测信号。

所有抗体孵育步骤都要在盖板下的 200μl 孔中进行。

为了排除二抗的非特异结合，我们进行了一组平行实验，即，将蛋白质芯片置于不含一抗的封闭液中孵育接着用相应的二抗进行孵育，包括上述的冲洗步骤。

图 28-4 显示了用单克隆抗 TCP1 抗体孵育一个拟南芥蛋白质芯片后的荧光图像。96 个通过全长 cDNA 表达克隆获得的拟南芥蛋白质吸附在 FAST 点样片基上（4×4 点样模式，在两个相同的区域中，水平方向上重复 2 次点样）。这张图显示抗 TCP1 抗体仅特异识别 TCp1 蛋白点，并且不会与其他吸附的拟南芥蛋白质发生交叉反应（图 28-4）。

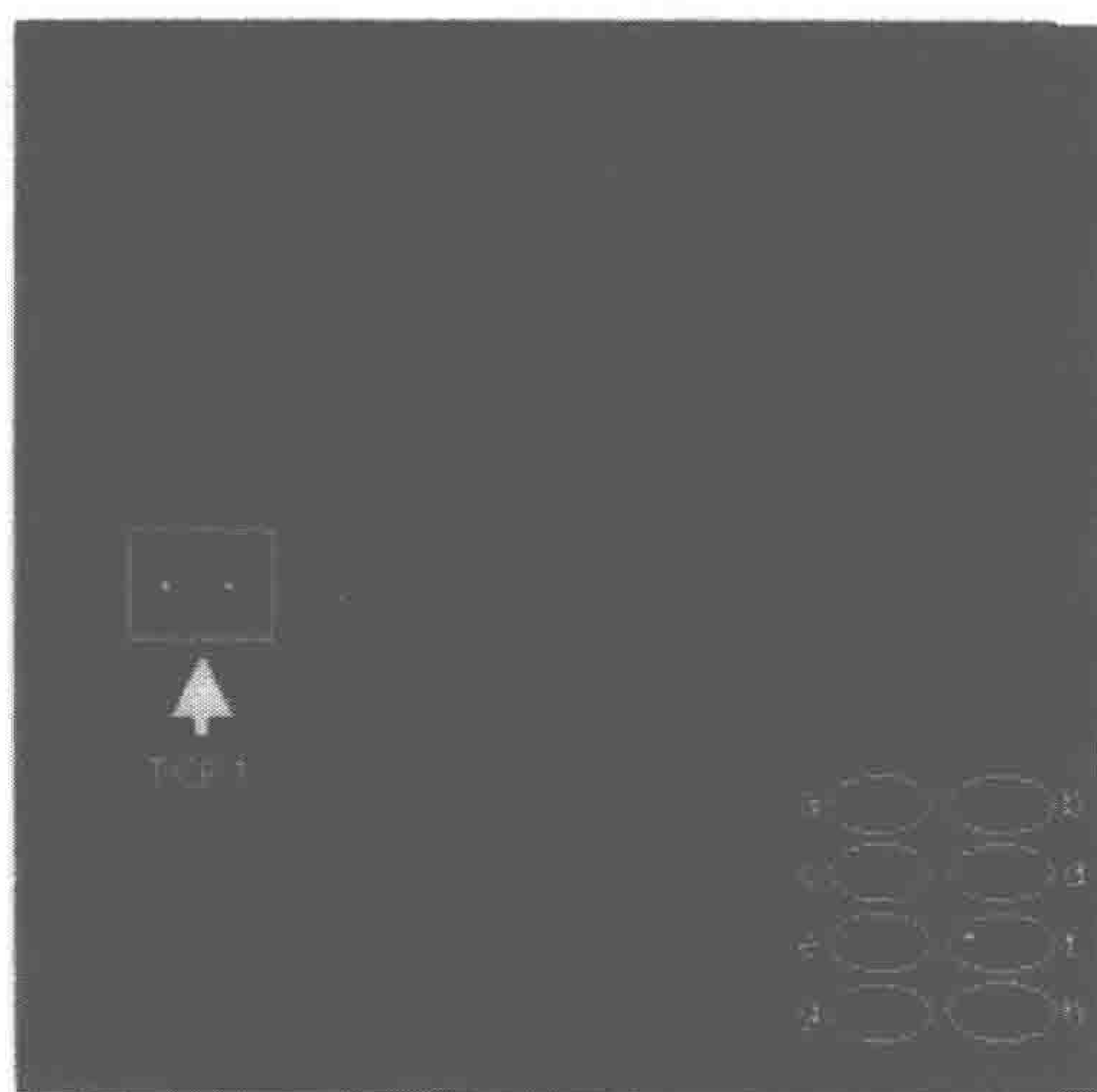


图 28-4　用抗 TCP1 抗体筛选一个含 96 个蛋白质的拟南芥蛋白质芯片

蛋白质从拟南芥全长 cDNA 表达克隆中表达和纯化获得。这些蛋白质和几个对照（a～h）按照 4×4 模式，水平方向上 2 次重复点样在 FAST 点样片基上，这些蛋白质芯片用抗 TCP1 抗体筛选。对照见图 28-3 的图例说明

2. FAST 点样片基上的多克隆抗体筛选

(1) FAST 点样片基室温下在鱼胶（10%溶解在 TBST 中）中封闭处理 1h。

(2) 将兔血清稀释在封闭液中（如抗 DOF11 的稀释比例为 1∶1 000，抗 MYB6 血清的稀释比例为 1∶500），然后室温下，用其孵育芯片点样片基 1h。

(3) 用 TBST 冲洗 2 次，每次 10min。

(4) 点样片基在室温下用羊抗兔子 IgG-Cy3 配体继续孵育 1h，配体以 1∶800 的比例稀释在封闭液中（见注释 13）。

(5) 用 TBST 冲洗 3 次，每次 30min。

(6) 在扫描之前，我们用微孔板离心机甩干芯片（Eppendorf，Hamburg，Germany，产品目录号：5810R）或人工吹干。

(7) 用 428Arrayscanner 扫描仪或 ScanArray 4000 扫描仪检测信号。所有抗体孵育步骤都要在盖板下的 200μl 孔中进行。

28.3.4　图像分析

点的平均强度数据（扣除背景）可通过 GenePixPro4.0 获得；如果要做进一步的比较，强度平均值可通过计算重复的点获得。

28.4　注　　释

(1) 在进行每次蛋白质纯化之前，要调节所用缓冲液的 pH。

(2) 为了得到高浓度的特异重组蛋白提取物（如在低拷贝质粒上重组蛋白质）用于随后的蛋白质纯化，我们可以同时用 100μl 裂解液分别裂解两个相同的 1ml 培养物的沉淀物，合并得到 200μl 裂解物，供下一步分析[15]。

(3) 小心吸取上清液，只将那些澄清的上清液转移到过滤板上，以确保在随后的过滤中板不会被堵塞。

(4) 使用适用于微孔板的真空泵。

(5) 确保在过滤后没有液体残留在过滤板下面；如果有的话，必须手动清除。为了避免这个问题的出现，过滤要在足够的真空压下尽快进行（要快速建立真空且持续时间不要过长，否则，过滤板就会过于渗漏）。

(6) 另一个高通量纯化蛋白质的方法就是应用 Qiagen BioRobot 8000 和 Ni-NTA-Superflow 96 BioRobotKit（Qiagen）系统[14]，使用与手工纯化相同的缓冲液来裂解、冲洗和洗脱（见 28.2.1）。与手工纯化方法相比，机器自动纯化方法的劣势就是实验药品消耗较大，以及洗脱体积无法调节到低于 350μl。用手工纯化方法，洗脱体积可从 30～80μl，较小的洗脱体积有利于纯化那些表达量较小的蛋白质。

(7) 在 FAST 片基表面涂上一层硝酸纤维素衍生的聚合物，就表面结构来说，它们属于 3D 芯片，比 2D 芯片具有更强的固定能力。在使用单克隆抗体进行抗原-抗体相互作用的研究中，除了使用 FAST 片基外，我们还使用了自制的 PAA 片基。PAA 片基是根据已报道的方法制备的[15,41]。Angenendt 及其同事比较了用于抗原-抗体相互作用研究的不同芯片表面材料的特性[41,42]。我们综述了不同芯片表面材料在包括抗原-抗体相互作用在内的不同芯片的应用[2]。

(8) 将无蛋白质溶液（洗脱缓冲液，PBS）和一个不含 RGS_6 标记的无关蛋白质（BSA）作为负对照，我们用 Cy3 标记的二抗（如小鼠 IgG -Cy3 二抗）作为正对照。为了检测二抗的结合效果，我们点样相应的单克隆一抗和同物种的 IgG（如与小鼠抗 RGS-His6 抗体一起做筛选实验的小鼠 IgG，或与多克隆血清一起做筛选实验的大鼠 IgG）用来作为额外的正对照。

(9) 根据需要分析的蛋白质数量及其重复数目，决定用于抗原-抗体相互作用研究

的芯片点样模式。那些能用荧光检测分辨出来的点的最大点样密度主要依赖于点样方法和芯片扫描仪的分辨率。当我们采用我们自己的点样方法，分辨率为 10μm 的扫描仪，点样模式为 14×14（点间距为 321μm）或 15×15（点间距是 300μm）时，我们可获得足以判定荧光信号的分辨率（数据未显示）。至今我们还没有实验更大的点样模式。Lueking 和他的同事[15]成功地使用 PAA 片基，用相同的点样方法，成功地以 13×13 的点样模式在同一个点上反复点样 5 次，用荧光检测进行抗体-抗原相互作用的研究。Michaud 和他的同事甚至用更高的点样密度（16×18）的蛋白质芯片和荧光检测来分析抗体。除了其他方面的应用，我们还综述了运用蛋白质芯片进行不同抗原-抗体相互作用的研究[2]。

（10）我们在进行"原则证明"性研究分析植物抗体时，以 4×4 水平方向上重复 2 次点样模式，点间距为 1050μm[14]，在片基上的两个相同区域点样。

（11）如果在文献中未查到最佳抗体稀释比例，可在芯片研究工作开始之前，通过 Western 印迹实验来确定。

（12）为了防止芯片在与抗体孵育的过程中干燥，我们把芯片放在用 TBST 润湿的 Whatman 滤纸上。

（13）由于二抗被荧光标记，因此，这一步骤以及其后的每个步骤实验均需在黑暗中进行。

（14）荧光标记的二抗 4℃下保存，或加入甘油（终浓度为 50%）保存在－20℃。

（15）我们采用另一种在 FAST 片基上筛选单克隆抗体的方法：FAST 片基室温下，用 1×PBS、0.5%（*V/V*）Tween-20 溶液封闭 2h。将适当的单克隆抗体稀释液在室温下孵育芯片 2h，然后用封闭液冲洗两次，每次 10min。用相应的 Cy3 标记二抗（与一抗物种特异性主相关）室温下进一步孵育 FAST 片基 1h。在信号检测之前，片基在室温下用 1×PBS/0.5%（*V/V*）Tween-20 冲洗两次，每次 30min，然后用 1×PBS 冲洗两次，每次 20min。

如果使用单克隆抗 PhyB 抗体 Pea-25[43]，只能用本方法在 FAST 片基上检测 PhyB[14]。用在 28.3.3 节 1 中介绍的方法，我们检测不到 PhyB。

致谢

感谢 Alexandra Possling 和 Andrea König 校阅本文稿。

参 考 文 献

1. LaBaer, J. and Ramachandran, N. (2005) Protein microarrays as tools for functional proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9,** 14–19.
2. Feilner, T., Kreutzberger, J., Niemann, B., et al. (2004) Proteomic studies using microarrays. *Curr. Proteomics* **1,** 283–295.
3. Templin, M. F., Stoll, D., Schwenk, J. M., Potz, O., Kramer, S., and Joos, T. O. (2003) Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* **3,** 2155–2166.

4. Zhu, H. and Snyder, M. (2003) Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7,** 55–63.
5. Miller, J. C., Zhou, H., Kwekel, J., et al. (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics* **3,** 56–63.
6. Nielsen, U. B. and Geierstanger, B. H. (2004) Multiplexed sandwich assays in microarray format. *J. Immunol. Methods* **290,** 107–120.
7. Shao, W., Zhou, Z., Laroche, I., et al. (2003) Optimization of Rolling-Circle Amplified Protein Microarrays for Multiplexed Protein Profiling. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003,** 299–307.
8. Kramer, A., Feilner, T., Possling, A., et al. (2004) Identification of barley CK2alpha targets by using the protein microarray technology. *Phytochem.* **65,** 1777–1784.
9. Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., et al. (2000) Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* **26,** 283–289.
10. Boutell, J. M., Hart, D. J., Godber, B. L., Kozlowski, R. Z., and Blackburn, J. M. (2004) Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. *Proteomics* **4,** 1950–1958.
11. Chan, S. M., Ermann, J., Su, L., Fathman, C. G., and Utz, P. J. (2004) Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nat. Med.* **10,** 1390–1396.
12. Haab, B. B., Dunham, M. J., and Brown, P. O. (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol.* **2,** RESEARCH0004.
13. Michaud, G. A., Salcius, M., Zhou, F., et al. (2003) Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat. Biotechnol.* **21,** 1509–1512.
14. Kersten, B., Feilner, T., Kramer, A., et al. (2003) Generation of *Arabidopsis* protein chips for antibody and serum screening. *Plant Mol. Biol.* **52,** 999–1010.
15. Lueking, A., Possling, A., Huber, O., et al. (2003) A nonredundant human protein chip for antibody screening and serum profiling. *Mol. Cell. Proteomics* **2,** 1342–1349.
16. Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., et al. (2004) Self-assembling protein microarrays. *Science* **305,** 86–90.
17. Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., et al. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293,** 2101–2105.
18. Kersten, B., Possling, A., Blaesing, F., Mirgorodskaya, E., Gobom, J., and Seitz, H. (2004) Protein microarray technology and ultraviolet crosslinking combined with mass spectrometry for the analysis of protein-DNA interactions. *Anal. Biochem.* **331,** 303–313.
19. Snapyan, M., Lecocq, M., Guevel, L., Arnaud, M. C., Ghochikyan, A., and Sakanyan, V. (2003) Dissecting DNA-protein and protein-protein interactions involved in bacterial transcriptional regulation by a sensitive protein array method combining a near-infrared fluorescence detection. *Proteomics* **3,** 647–657.
20. MacBeath, G. and Schreiber, S. L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289,** 1760–1763.
21. Kim, S. H., Tamrazi, A., Carlson, K. E., and Katzenellenbogen, J. A. (2005) A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology, receptor-selectivity,and heterodimer functionality. *Mol. Cell. Proteomics* **4,** 267–277.

22. Kim, T. E., Park, S. W., Cho, N. Y., et al. (2002) Quantitative measurement of serum allergen-specific IgE on protein chip. *Exp. Mol. Med.* **34,** 152–158.
23. Robinson, W. H., DiGennaro, C., Hueber, W., et al. (2002) Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat. Med.* **8,** 295–301.
24. Angenendt, P., Glokler, J., Konthur, Z., Lehrach, H., and Cahill, D. J. (2003) 3D protein microarrays: performing multiplex immunoassays on a single chip. *Anal. Chem.* **75,** 4368–4372.
25. Kersten, B., Wanker, E. E., Hoheisel, J. D., and Angenendt, P. (2005) Multiplexing approaches in protein microarray technology. *Expert Rev. Proteomics* **2,** 499–510.
26. Kersten, B., Bürkle, L., Kuhn, E. J., et al. (2002) Large-scale plant proteomics. *Plant Mol. Biol.* **48,** 133–141.
27. Kersten, B., Feilner, T., Angenendt, P., Giavalisco, P., Brenner, W., and Bürkle, L. (2004) Proteomic approaches in plant biology. *Curr. Proteomics* **1,** 131–144.
28. Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., and Rakwal, R. (2005) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants. Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* **815,** 137–145.
29. Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., and Rakwal, R. (2005) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part II: Proteomes of the complex developmental stages. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* **815,** 125–136.
30. Agrawal, G. K., Yonekura, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., and Rakwal, R. (2005) System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part I: Technologies in proteome establishment. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* **815,** 109–123.
31. Thiellement, H., Zivy, M., and Plomion, C. (2002) Combining proteomic and genetic studies in plants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **782,** 137–149.
32. Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrin, J., Mock, H. P., and Rossignol, M. (2004) Plant proteome analysis. *Proteomics* **4,** 285–298.
33. Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., et al. (2005) High-throughput identification of potential *Arabidopsis* MAP kinases substrates. *Mol. Cell. Proteomics* **4,** 1558–1568.
34. Weiner, H., Faupel, T., and Bussow, K. (2004) Protein arrays from cDNA expression libraries, in *Methods in Molecular Biology* (Fung, E., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 11–13.
35. Bussow, K., Cahill, D., Nietfeld, W., et al. (1998) A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Res.* **26,** 5007–5008.
36. Clark, M. D., Panopoulou, G. D., Cahill, D. J., Bussow, K., and Lehrach, H. (1999) Construction and analysis of arrayed cDNA libraries [Review]. *Methods Enzymol.* **303,** 205–233.
37. Heyman, J. A., Cornthwaite, J., Foncerrada, L., et al. (1999) Genome-scale cloning and expression of individual open reading frames using topoisomerase I-mediated ligation. *Genome Res.* **9,** 383–392.
38. Walhout, A. J., Temple, G. F., Brasch, M. A., et al. (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol.* **328,** 575–592.

39. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.
40. Soldatov, A. V., Nabirochkina, E. N., Georgieva, S. G., and Eickhoff, H. (2001) Adjustment of transfer tools for the production of micro- and macroarrays. *Biotechniques* **31,** 848–854.
41. Angenendt, P., Glokler, J., Murphy, D., Lehrach, H., and Cahill, D. J. (2002) Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal. Biochem.* **309,** 253–260.
42. Angenendt, P., Glokler, J., Sobek, J., Lehrach, H., and Cahill, D. J. (2003) Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications. *J. Chromatogr. A* **1009,** 97–104.
43. Cordonnier, M. M., Greppin, H., and Pratt, L. H. (1986) Identification of a highly conserved domain on phytochrome from angiosperms to algae. *Plant Physiol.* **80,** 982–987.

第29章　利用植物蛋白质芯片研究蛋白磷酸化

Tanja Feilner 和 Birgit Kersten

摘要　鉴定蛋白激酶底物是蛋白激酶研究的一个主要焦点，并为解析信号转导途径及其复杂的调节提供证据。我们在此介绍一种以蛋白质芯片技术为基础的离体实验方法，用特异蛋白激酶对固定在芯片上的蛋白质进行系统磷酸化筛选。这种高通量方法可以用来鉴定可能的激酶底物。这个方法从包含数百个纯化重组的组氨酸标记蛋白质的植物蛋白质芯片开始，要用可溶解的、有活性的激酶，在具有放射性的ATP（γ^{33}-ATP）存在的环境下孵育芯片。一次芯片实验只需要少量有活性的激酶。然后用磷屏成像仪或X射线胶片检测放射性信号。在活体内激酶与底物不能相互作用时，鉴定到的可能的蛋白激酶底物必须通过其他的体外或体内的方法进行确定。此筛选方法可以通用于鉴定多种蛋白激酶的可能底物的直接鉴定。

关键词　蛋白质芯片；蛋白激酶；高通量；磷酸化筛选；激酶底物；靶

29.1　前　　言

蛋白质翻译后磷酸化修饰是影响真核细胞每一个细胞内活动过程的最丰富的细胞调节形式。一个蛋白质的磷酸化能引起结构、稳定性、酶活，与其他分子之间相互作用的能力或其亚细胞定位的改变。蛋白激酶催化可逆的蛋白质底物的磷酸化，作用在其丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基位点上。如在拟南芥中，丝氨酸/苏氨酸激酶占整个蛋白质组的4%[1]，但对它们的生物学功能还不十分了解。因此，我们需要能开展蛋白激酶全球分析的高通量蛋白质组学方法[2,3]来鉴定下游底物。

用于确定磷酸化共有位点的序列，包括肽库[4]和肽芯片[5,6]的多种技术可用来鉴定激酶底物。此外，一种λ噬菌体cDNA表达文库的固相磷酸化筛选[7,8]以及不同蛋白质相互作用筛选方法，如覆盖方法[9-11]和酵母双杂交系统[12-14]已被应用在这方面。最近，蛋白激酶被改造成可接受人工合成的腺苷三磷酸盐（环戊基ATP）模拟物，并用于鉴定特异底物[15-17]。初步的研究已经证明，通过激酶来研究磷酸化的蛋白质芯片是可行的[18,19]。为了确定磷酸化位点，抗磷酸化蛋白表位[6]的抗体将用于蛋白质芯片检测。此外，肽芯片或基于质谱的方法[20,21]也可以用于这方面。

我们在此介绍基于蛋白质芯片技术的蛋白磷酸化筛选方法和高通量确定蛋白激酶底物的方法。我们已成功地用这种筛选工具鉴定大麦酪蛋白激酶2α（CK2α）和不同的拟南芥丝裂原活化蛋白（MAP）激酶[23]的新靶标。我们这个方法使用本书第28章详细描述的植物蛋白质芯片（见第28章）。在放射性【γ^{33}磷】三磷酸腺苷存在的条件下，用

可溶和具有活性的激酶孵育芯片。通过磷屏成像仪或 X 射线胶片检测到的放射性信号，对可能的底物进行筛选。我们通过离体印迹磷酸化作用来确认可能的底物。总的来说，我们的方法能筛选植物蛋白激酶用于进一步的分析，随后的体内实验对评估它们的生理作用是必不可少的[13,24,25]。

29.2 材　　料

29.2.1 非变性条件下重组激酶的纯化

（1）培养细胞的培养基：含 100μg/ml 氨苄青霉素，15μg/ml 卡那霉素，2%葡萄糖的 2YB 或 LB 培养基。

（2）异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）。

（3）非变性裂解液：300mmol/L NaCl，50mmol/L NaH_2PO_4，10mmol/L 咪唑，pH 8.0。

（4）非变性洗涤液：300mmol/L NaCl，50mmol/L NaH_2PO_4，20mmol/L 咪唑，pH 8.0。

（5）非变性洗脱液：300mmol/L NaCl，50mmol/L NaH_2PO_4，250mmol/L 咪唑，pH 8.0。

（6）溶菌酶。

（7）苯甲基磺酰氟（PMSF）。

（8）超声匀浆器（Branson Ultrasonic，Danbury，CT）。

（9）NiNTA-琼脂糖（NTA：nickel-nitrilotri-acetic acid，镍-三乙酸基氨，Qiagen）。

（10）1ml 聚丙烯柱（Qiagen，Hilden，Germany）。

（11）Bradford 试剂（Bio-Rad，Munich，Germany）。

29.2.2 蛋白质芯片上的激酶检测

（1）TBS＋Tween（TBST）：10mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，150mmol/L NaCl，0.1%（V/V）Tween-20。

（2）封闭液：2%牛血清白蛋白（BSA；Sigma，St. Louis，MO）溶解在 TBST 中。

（3）[γ^{33}-P] ATP，250μCi/ml（Amersham Pharmacia Biotech Europe，Freiburg，Germany）。

（4）CK2α 缓冲液：25mmol/L Tris-HCl pH 8.5，10mmol/L $MgCl_2$，1mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）。

（5）FAST 片基（Whatman Schleicher & Schuell，Dassel，Germany）。

（6）盖片（Carl Roth，Karlsruhe，Germany）。

（7）X 射线暗盒（Hypercassette，Amersham Pharmacia，Freiburg，Germany）。

（8）X 射线胶片（Kodak，Stuttgart，Germany）。

（9）成像板（BAS-SR 2025，Fujifilm，Japan）。

（10）磷屏显像仪（BAS-Reader-5000，Fujifilm）。

29.3　方　　法

29.3.1　非变性条件下重组激酶的纯化

用于磷酸化筛选的激酶必须是可溶和有活性的，且无其他激酶参杂的纯化激酶。因此，我们可以从 cDNA 表达文库中，大量生产和纯化组氨酸标记的重组蛋白质激酶，这些 cDNA 表达文库包括，用大肠杆菌载体 pQE30NST（检索编号：AF074376；22）构建的大麦表达文库，或用 pQE30NASTattB 载体（检索编号：AY386205；23；也可见 28.3.1）构建的拟南芥表达文库。我们用以下方法从这些文库中表达并纯化蛋白激酶。

表达：

（1）在 Falcon 离心管（50ml）中加入 10ml 细胞培养基。

（2）将培养物与表达组氨酸标记蛋白激酶的细菌一起接种到培养基中，这些细菌取自于保存于－80℃的 384 微孔板。

（3）经 37℃剧烈摇晃过夜培养后，将细胞培养物转移至含有 90ml 预热的 2YT 培养基的 300ml 三角瓶中，2YT 培养基中含 100μg/ml 氨苄青霉素，15μg/ml 卡那霉素。继续培养至 OD 值达到 0.7。

（4）为了诱导蛋白质的表达，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，继续在 37℃培养 4h。

（5）将细胞培养物转移至 50ml 的 Falcon 离心管中（每种细胞培养物转移到两个离心管中），1 900*g* 离心 10min，收集细胞，并立即保存于－80℃。

非变性蛋白质纯化（以下步骤均在 0～4℃下操作）：

（1）取出－80℃冰冻保存的沉淀物，在冰上解冻。

（2）用 0.5ml 含 0.25mg/ml 溶菌酶和 0.1mmol/L PMSF 的裂解液裂解处理细胞。

（3）汇总裂解产物，用设置为一半功率的超声匀浆器在冰浴条件下剪切处理裂解产物中的 DNA 3 次，每次 1min。

（4）将裂解产物转移至 1.5ml 离心管中，20 000*g*，4℃离心 30min。

（5）将上清液转移至新的离心管中。

（6）加入 250μl 的 NiNTA-琼脂糖，4℃ 300r/min 振摇 1h，以结合组氨酸标记的蛋白质。

（7）将混合物转移至 1ml 的聚丙烯柱子中。

（8）用 10 倍体积的非变性洗涤液洗涤柱子。

（9）蛋白质分 4 步洗脱步骤洗脱，每次洗脱用 0.5ml 非变性洗脱液。

（10）蛋白质与甘油［终浓度为 20%（*V/V*）］混合后保存于－80℃（见注释 1）。

我们建议在每一步的离心、裂解、洗涤和洗脱过程中，取小样进行聚丙烯酰胺凝胶（如 15%）电泳（图 29-1），检验这些纯化步骤的效率。用 Bradford 检测方法确定蛋白质浓度[26]。

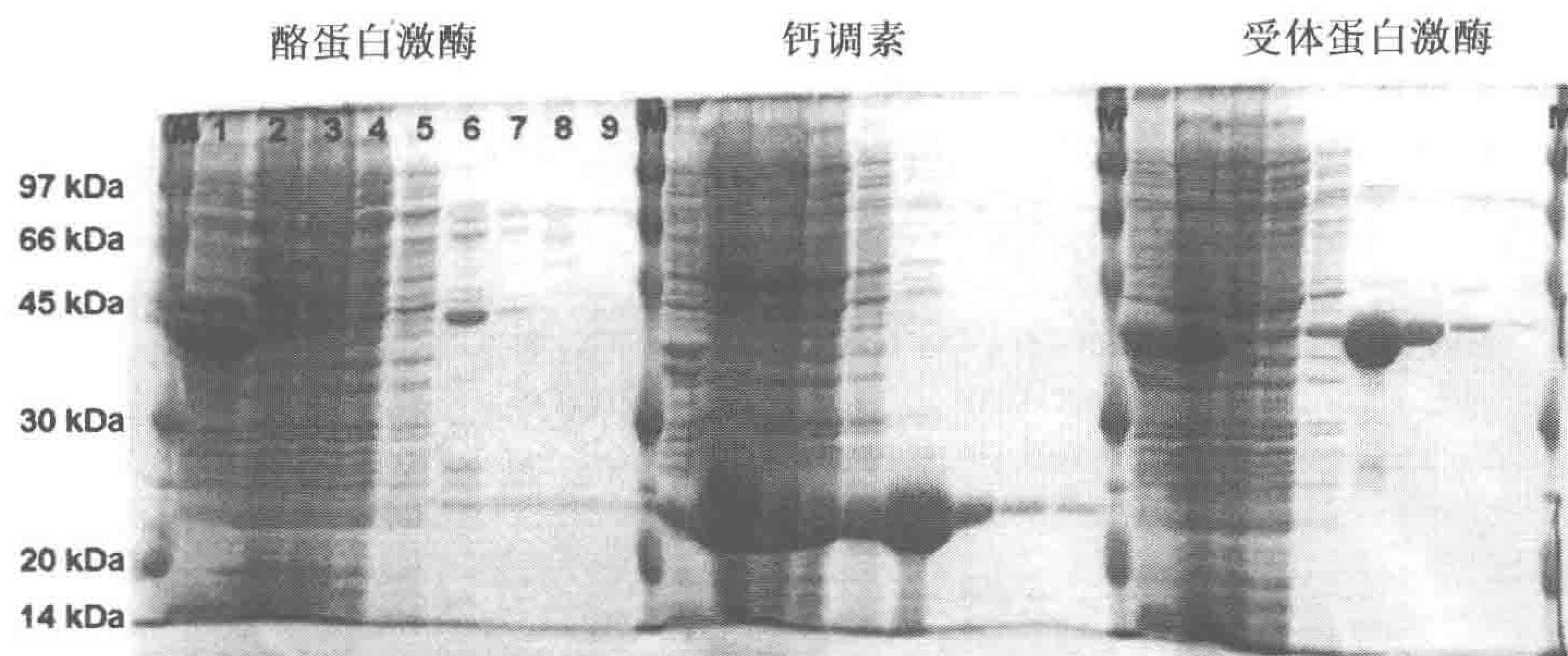


图 29-1　两个非变性的激酶和钙调素的 SDS-PAGE（15%）电泳（考马斯亮蓝染色）
每一个纯化步骤的 9 个样品分别为：1. 沉淀物（离心后的不溶性组分）；2. 上清（离心后的可溶性组分）；3. 第一次柱子的洗出液；4、5. 第一次和第二次的洗出组分；6～9. 洗脱组分。M：标准分子质量。蛋白质标准分子质量在左侧用 kDa 单位表示

29.3.2　蛋白质芯片上的激酶检测

建议在进行芯片实验之前，先用一个已知的底物作正对照，检测激酶的活性（见注释 2，3）。同时还必须排除这个激酶对重组蛋白质对 3′或 5′端标记物磷酸化作用的可能性，如组氨酸标记（见注释 4）。

在此，我们介绍一种激酶检测后的信号分析方法。我们将样品蛋白质和对照（见注释 3）用 10×10 的点样模式（见注释 6），点样在 FSAT 片基上（见注释 5），每个样品重复点样 4 次。用于定量分析的点样模式最近已被报道[23]。

激酶检测：

（1）将在 4℃密封保存的头一天点样的蛋白质芯片（构建方法参见第 28 章）室温下用 TBST 剧烈振摇洗涤 1h（见注释 7）。

（2）用 2% BSA/TBST 在室温条件下对洗过的芯片进行封闭处理 1h。

（3）将封闭处理过的芯片放置在用 TBST 浸泡过的 Whatman 滤纸上，这样可以使芯片在接下来的激酶反应过程中不会干燥。

（4）室温下，将芯片置于 250μl 激酶溶液中孵育 1h，激酶溶液包含 13μg/ml 的 CK2α 和 25μCi/ml 放射性标记的［γ^{33}-P］ATP（见注释 1）。孵育过程要加盖进行。

（5）用 TBST 洗涤 6 次，每次 30min。

（6）最终，芯片用微量滴定板离心机（如 Eppendorf，Hamburg，Germany，产品目录号：5810R）干燥，或者手动吹干，然后转移至 X 射线盒。

（7）用 X 射线胶片进行信号检测，将胶片放在芯片上，X 射线盒在－80℃保存适当的时间（见注释 8）。然后，胶片在暗室中冲洗显影。另一种检测方法是，将胶片曝光于成像板上，然后用磷屏显像仪进行信号检测（见注释 8）。

图 29-2（左）显示了 CK2α 磷酸化筛选实验中，芯片对 X 射线胶片曝光后的典型

结果，几个蛋白质的 4 次重复点样在胶片上给出了不同的信号。

为了确定组氨酸标记的重组蛋白质在芯片上的定位，我们用本书中介绍的（见第 28 章）一种抗 RGS-His6 的抗体筛选这些蛋白质。几乎所有点样蛋白质都可以被检测到（约 95%），如图 29-2（右）所示。

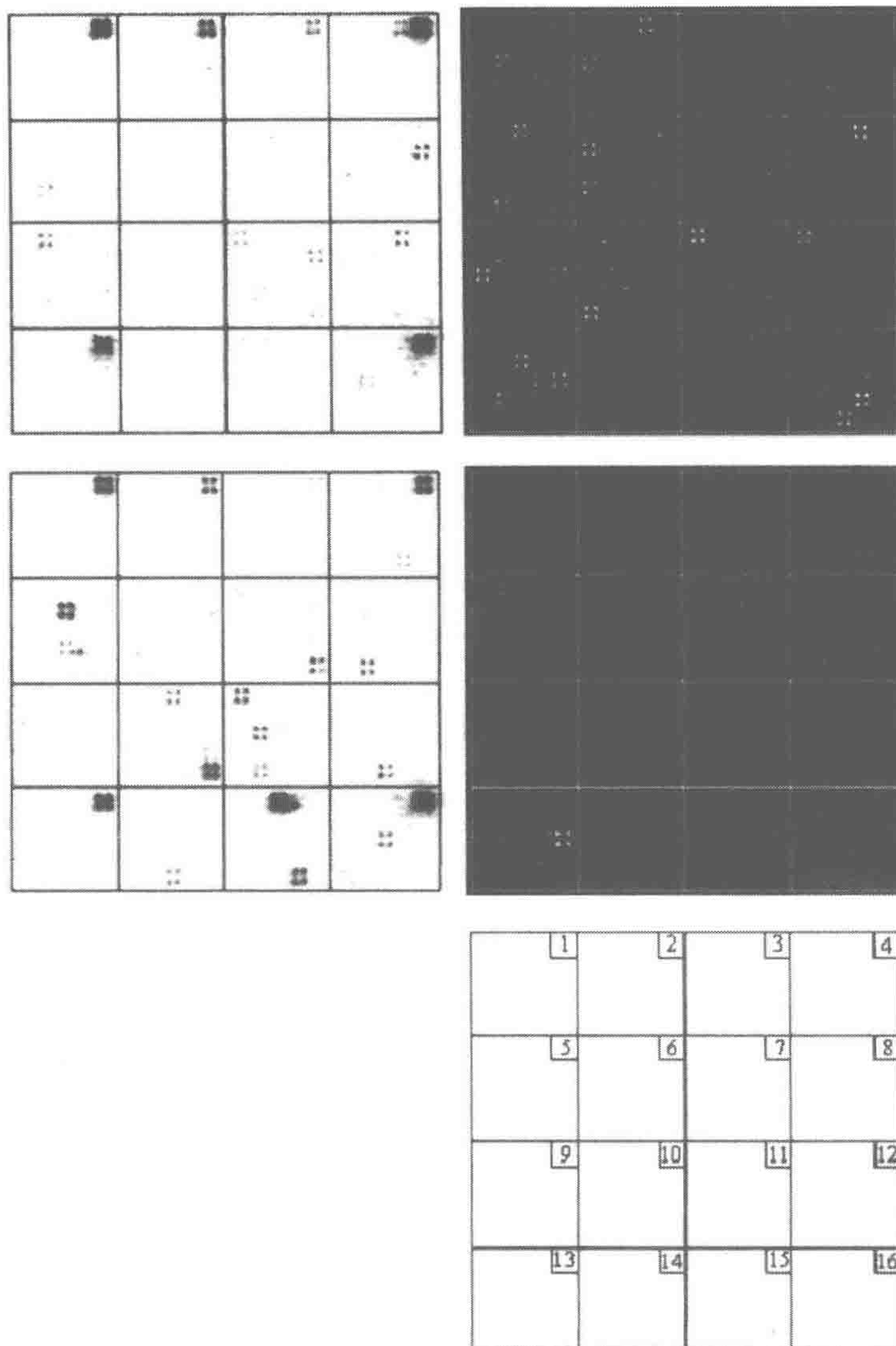


图 29-2　固定在 FAST 片基上的 768 个不同的大麦蛋白质的激酶及其免疫检测

左：一个代表性的 CK2α 检测结果的 X 射线胶片图像。右：用抗 RGSHis6 抗体筛选得到的相同的芯片。底部的图表明 16 个对照的位置。纯化的蛋白质和对照都点样 4 次。对照：1、4、13 和 16，高迁移率群（HMG）（1），0.29mg/ml；2. HMG（2），0.76mg/ml；3. HMG（3），0.28mg/ml；5. CK2α，0.22mg/ml；6. 其他文库激酶，0.21mg/ml；7. 人类甘油 3-磷酸脱氢酶，0.36mg/ml；8. 牛血清白蛋白，20pmol/l 溶解在 PBS 中；9. 非变性洗脱液；10. 变性洗脱缓冲液；11. 小鼠抗 RGS-His_6 抗体，用 PBS 以 1∶10 的比例稀释；12. 兔抗小鼠 IgG-Cy3 二抗，用 PBS 以 1∶25 比例稀释；14. 水；15. PBS（经作者同意，摘自参考文献 22，版权 2004 Elsevier Science）

29.3.3　潜在激酶靶蛋白的选择

在进行信号分析时，需要这个激酶不同方式的两个独立的实验结果。

潜在激酶靶蛋白的选择标准：

（1）在一个实验中如果一个样品的所有 4 个点样点在 X 射线胶片或磷屏显像仪上都给出一个相同的信号（图 29-2），那么这个蛋白质被认为是阳性的。

（2）如果在两次实验中都得到了阳性结果，这个蛋白质就被认为是一个可能的靶蛋白。

例如，从接近 800 个不同的大麦蛋白中鉴定出 21 个可能的 CK2α 靶蛋白[22]。最近报道了一种芯片磷酸化后用基于阈值的定量系统筛选潜在靶蛋白的方法。

29.3.4　潜在磷酸化靶蛋白的验证

当使用这种基于芯片的磷酸化方法作为一种离体外鉴定潜在磷酸化靶蛋白质的筛选工具时，这些被鉴定的蛋白质要用其他方法进行验证，包括离体与活体的方法，其中一些方法已在前言中提及。

我们用印迹磷酸化检测来离体验证潜在底物：

（1）用 SDS-PAGE 分离蛋白质，如用 15% SDS-PAGE，然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上。转膜后，用考马斯亮蓝染色凝胶，检验蛋白质的转移效率。

（2）用本书中介绍的基于芯片检测的反应条件以及适当的体积，在印迹膜上进行磷酸化反应。

图 29-3 显示了印迹磷酸化实验的一个经典的例子。我们对在两个芯片实验中用 MAP 激酶鉴定为潜在底物的 48 个蛋白质进行验证，几乎所有的蛋白质都得到了确认，如图 29-3 所示。我们使用与芯片实验相同的阳性对照：不同浓度的髓鞘碱性蛋白（MBP、MAP 激酶的人工底物）。阴性对照蛋白用那些在基于芯片的激酶检测中检测到，但还未被鉴定为是潜在底物的蛋白质（图 29-3）。

其他的体外验证方法是在溶液中进行的磷酸化检验，应用 SDS 电泳和放射性自显影检测磷酸化蛋白质[8,23]。Fukunaga 和 Hunter 曾用这种方法来验证用噬菌体 cDNA 表达文库磷酸化筛选鉴定的激酶底物[8]。

29.4　注　　释

（1）我们建议在激酶中加入甘油［终浓度为 20%（*V*/*V*）］后保存在－80℃，或将激酶在合适的缓冲液环境中冷冻干燥后保存在－80℃，使用前，冻干的激酶要先用 ddH_2O 溶解。

（2）在进行基于芯片的激酶实验前，我们建议对激酶制备物进行胶内活性检测实验，或用相应激酶（见注释 3）的已知底物在溶液中对激酶的活性进行检测。如果在文献中未查到激酶的最佳活化条件，那么每种激酶的最优活化条件（如最佳缓冲液条件、激酶的浓度、激酶的孵育时间）要通过实验来确定。

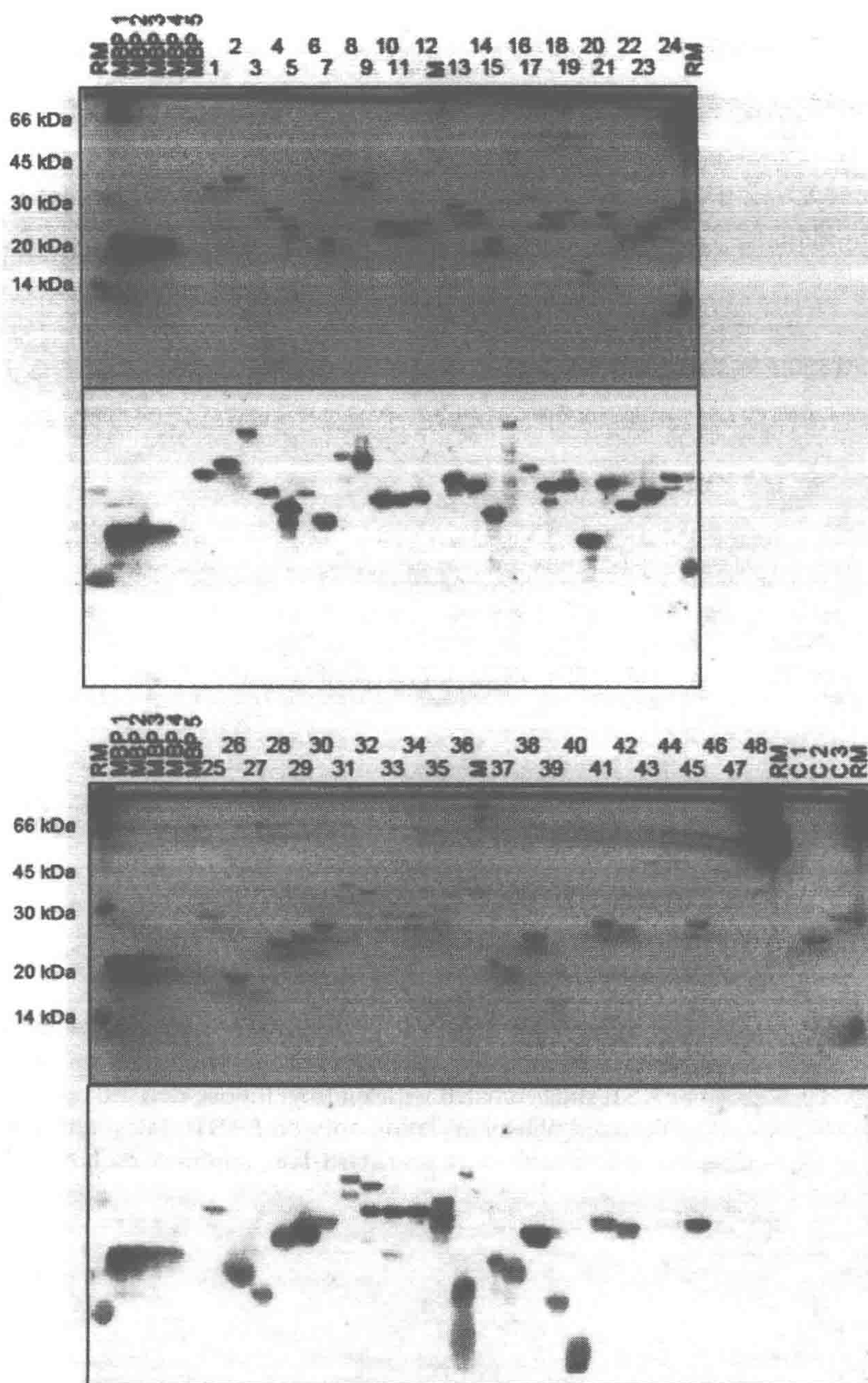


图 29-3　激酶底物的验证

上面部分显示可能的激酶底物的 SDS-PAGE（15%）电泳，下面部分显示这些蛋白质经过印迹和激酶反应后的放射自显影图（下部）。凝胶在电泳和印迹后用考马斯亮蓝染色

（3）建议使用一种阳性对照（如该激酶的一个已知底物）。在研究大麦 CK2α 实验中[22]，我们用阳性对照来区别大麦蛋白，它们和不同植物 HMG（高迁移率群）的蛋白质具有很高的同源性，这些蛋白质就是众所周知的 CK2α 靶蛋白[28,29]。在另一项研究实

验中，我们用已知的人工合成 MAP 作为阳性对照，分析研究拟南芥的不同 MAP 激酶[23]。

（4）重组蛋白质除了含有各自的蛋白质的编码序列外，常常还包含由克隆载体所编码的 3′或 5′标记物。这些标记物的磷酸化可能会导致假阳性结果，因此在芯片实验之前要将其排除掉。用一些已知的不被认为是相应激酶底物，并且具有相同表达模式（相同标记物）的重组蛋白质，在溶液中进行活性激酶的检测实验可能是一种解决问题的办法。在这个检测实验中，这些所选择的蛋白质应该显示阴性结果。

（5）我们曾对在表层镀膜的 FAST 片基上（表层被硝化纤维来源的聚合物所覆盖）和环氧树脂片基上固定的变性蛋白质进行磷酸化处理，尽管含组氨酸标记蛋白质在这两个片基表层上可被抗 RGS-His_6 的抗体检测到，但我们仅在 FAST 片基上检测到蛋白质磷酸化。在其他研究中，纳米井[19]，BSA-NHS（BSA-*N*-羟基丁二酰亚胺）片基[18]或 SAM2（抗生物素蛋白链菌素包被膜）片基[30]在芯片激酶实验中都可以被用作表面镀膜涂层。我们综述了不同的芯片表层在包括磷酸化研究在内的不同芯片应用[31]。

（6）在磷酸化实验中可被区别的个别点的最大点样密度极大地依赖于扫描图像板的磷屏显像仪。为确定点样密度，我们建议使用市售的蛋白激酶（如新英格兰 Biolabs 公司生产的 PKA）。当使用具有 10μm 分辨率的扫描仪（如 BioImager FLA 8 000，Fujifilm，Japan），结合 11×11 的点样模式（点距：410μm）时，我们可以得到足够的分辨率来分析放射信号。更高的点样模式不适合用于放射性检测，因为密集的点会干扰相邻点的信号，导致相邻蛋白信号强度的错误分析，以及错误的背景校正。

（7）TBST 洗涤芯片是为了去除芯片上的尿素，大家知道尿素会减弱芯片检测中激酶的活性。

（8）用 X 射线胶片检测放射信号时，将胶片放在用保鲜膜包裹的芯片上，曝光时间根据信号的强弱，可从 30min 到几天。由于 X 射线胶片变黑仅在一个非常有限的范围内与信号强度成线性或正比关系，因此 X 射线胶片的灵敏度可能会引发一些问题。用磷屏显像仪进行检测时，成像板放置在用保鲜膜包裹的芯片上，然后进行扫描。磷屏显像仪的检测灵敏度比 X 射线胶片的要高 10～100 倍，所以它能够更快地检测到结果，或检测到较弱的信号。此外，与 X 射线胶片相比，磷屏显像系统具有更宽的动态范围，它能在一种曝光强度下同时检测到强和弱的信号，而且信号与强度的线性相关性大于 5（100 000∶1），这表明在对放射信号定量分析方面，磷屏显像仪要好于 X 射线胶片。

致谢

感谢 Armin Kramer 提供图 29-1，感谢 Jasmin Bastian 对本文稿的校阅。

参考文献

1. Champion, A., Kreis, M., Mockaitis, K., Picaud, A., and Henry, Y. (2004) *Arabidopsis* kinome: after the casting. *Funct. Integr. Genomics* **4,** 163–187.
2. Phizicky, E., Bastiaens, P. I., Zhu, H., Snyder, M., and Fields, S. (2003) Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* **422,** 208–215.

3. Kersten, B., Feilner, T., Angenendt, P., Giavalisco, P., Brenner, W., and Bürkle, L. (2004) Proteomic approaches in plant biology. *Curr. Proteomics* **1,** 131–144.
4. Hutti, J. E., Jarrell, E. T., Chang, J. D., et al. (2004) A rapid method for determining protein kinase phosphorylation specificity. *Nat. Methods* **1,** 27–29.
5. Houseman, B. T., Huh, J. H., Kron, S. J., and Mrksich, M. (2002) Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat. Biotechnol.* **20,** 270–274.
6. Lesaicherre, M. L., Uttamchandani, M., Chen, G. Y., and Yao, S. Q. (2002) Antibody-based fluorescence detection of kinase activity on a peptide array. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12,** 2085–2088.
7. Fukunaga, R. and Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16,** 1921–1933.
8. Fukunaga, R. and Hunter, T. (2004) Identification of MAPK substrates by expression screening with solid-phase phosphorylation, in *Methods in Molecular Biology* (Seger, R., ed), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 211–236.
9. Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., and Harlow, E. (1998) Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes. Dev.* **12,** 456–461.
10. Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., et al. (2000) NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes. Dev.* **14,** 2283–2297.
11. Gao, G., Bracken, A. P., Burkard, K., et al. (2003) NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 2821–2833.
12. Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., and Cooper, J. A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16,** 1909–1920.
13. Fujita, H., Fujita, H., Takemura, M., et al. (2003) An *Arabidopsis* MADS-box protein, AGL24, is specifically bound to and phosphorylated by meristematic receptor-like kinase (MRLK). *Plant Cell Physiol.* **44,** 735–742.
14. Anderson, G. H. and Hanson, M. R. (2005) The *Arabidopsis* Mei2 homologue AML1 binds AtRaptor1B, the plant homologue of a major regulator of eukaryotic cell growth. *BMC Plant Biol.* **5,** 2.
15. Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., and Shokat, K. M. (1997) Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94,** 3565–3570.
16. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L., and Shokat, K. M. (1998) Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem. Biol.* **5,** 91–101.
17. Eblen, S. T., Kumar, N. V., Shah, K., et al. (2003) Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *J. Biol. Chem.* **278,** 14926–14935.
18. MacBeath, G. and Schreiber, S. L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289,** 1760–1763.
19. Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., et al. (2000) Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* **26,** 283–289.
20. Glinski, M., Romeis, T., Witte, C. P., Wienkoop, S., and Weckwerth, W. (2003) Stable isotope labeling of phosphopeptides for multiparallel kinase target analysis and identification of phosphorylation sites. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **17,**

1579–1584.

21. Ballif, B. A., Villen, J., Beausoleil, S. A., Schwartz, D., and Gygi, S. P. (2004) Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol. Cell. Proteomics* **3,** 1093–1101.
22. Kramer, A., Feilner, T., Possling, A., et al. (2004) Identification of barley CK2alpha targets by using the protein microarray technology. *Phytochemistry* **65,** 1777–1784.
23. Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., et al. (2005) High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase substrates. *Mol. Cell. Proteomics* **4,** 1558–1568.
24. Liu, Y. and Zhang, S. (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16,** 3386–3399.
25. Riera, M., Figueras, M., Lopez, C., Goday, A., and Pages, M. (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the abscisic acid responsive protein Rab17 from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101,** 9879–9884.
26. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72,** 248–254.
27. Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishihama, R., and Machida, Y. (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92,** 8660–8664.
28. Grasser, K. D., Maier, U. G., and Feix, G. (1989) A nuclear casein type II kinase from maize endosperm phosphorylating HMG proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162,** 456–463.
29. Stemmer, C., Schwander, A., Bauw, G., Fojan, P., and Grasser, K. D. (2002) Protein kinase CK2 differentially phosphorylates maize chromosomal high mobility group B (HMGB) proteins modulating their stability and DNA interactions. *J. Biol. Chem.* **277,** 1092–1098.
30. Boutell, J. M., Hart, D. J., Godber, B. L., Kozlowski, R. Z., and Blackburn, J. M. (2004) Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. *Proteomics* **4,** 1950–1958.
31. Feilner, T., Kreutzberger, J., Niemann, B., et al. (2004) Proteomic studies using microarrays. *Curr. Proteomics* **1,** 283–295.

索　引

［Ｇｅｎｅｒａｌ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ］
书名＝植物蛋白质组学实验指南
作者＝（法）Ｈ．蒂勒门特，Ｍ．齐维，Ｃ．达默韦达，Ｖ．米琴主编
页数＝３２１
ＳＳ号＝１４０７６１１２
ＤＸ号＝
出版日期＝２０１６．０７
出版社＝北京科学出版社